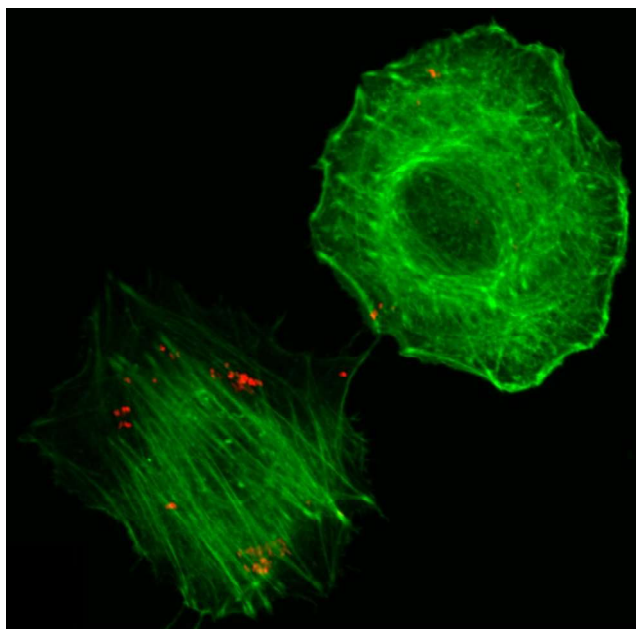


Licenciado DISTEL, Jesús Sebastián

Dinámica del citoesqueleto de actina de la  
célula hospedadora durante la infección con  
*Coxiella burnetii*



Trabajo de tesis realizado en el Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM) - CONICET, y presentado a la Facultad Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo, a través del Programa de Posgrado en Biología (PROBIOL), para la obtención del Título de Doctor en Ciencias Biológicas

Director: Doctor BERÓN, Walter

Co-Director: Dra. COLOMBO, María Isabel



**PROBIOL**  
PROGRAMA DE POSGRADO  
EN BIOLOGÍA

I H E M  
  
CONICET  
U . N . C U Y O

Mendoza, Argentina

2017

# ÍNDICE

Capítulo I: Introducción .....	1
I.1 El citoesqueleto .....	1
I.1.1 Estructura de la actina.....	3
I.1.2 Dinámica de los filamentos de actina .....	4
I.1.3 Las GTPasas Rho: modulares del citoesqueleto de actina .....	5
I.1.4 Proteínas de unión a actina.....	7
I.1.5 La vía de señalización de RhoA/ROCK .....	10
I.1.6 Miosinas .....	11
I.1.7 Las kinasas LIM .....	11
I.1.8 Las proteínas ERM .....	12
I.2 La vía endocítica .....	14
I.2.1 El proceso fagocítico .....	18
I.2.2 Trafico intracelular de un fagosomas.....	20
I.2.3 CD44 y su relación con el proceso fagocítico .....	23
I.3 Manejo de la vía endocítica por patógenos intracelulares .....	25
I.3.1 Vías de ingreso a la célula .....	25
I.3.2 Estrategias de sobrevivencia de patógenos dentro de la célula hospedadora .....	27
I.4 <i>Coxiella burnetii</i> .....	29
I.4.1 <i>Coxiella burnetii</i> y la fiebre Q .....	29
I.4.2 Epidemiología.....	30
I.4.3 Internalización de <i>Coxiella burnetii</i> .....	31
I.4.4 Biogénesis de la Vacuola que contiene a <i>Coxiella burnetii</i> .....	33
Capítulo II: Hipótesis y objetivos .....	36
II.1 Hipótesis.....	36
II.2 Objetivo General .....	36
II.2.1 Objetivos Específicos.....	36
Capítulo III: Resultados.....	37
III.1 Resultados del primer objetivo específico .....	37
III.1.1 La sobreexpresión de RhoGDI $\alpha$ afecta la internalización de <i>Coxiella burnetii</i> .....	37
III.1.2 La internalización de <i>Coxiella burnetii</i> es disminuida por el tratamiento con blebistatina.....	40
III.1.3 LIMK 2 no interviene en el proceso de internalización de <i>Coxiella burnetii</i> .....	42
III.1.4 Ezrina actúa durante la internalización de <i>Coxiella burnetii</i> .....	44
III.1.5 La fosforilación de ezrina es necesaria para la internalización de <i>Coxiella burnetii</i> .	48

III.1.6 Rol de ezrina en la vía de señalización de ROCK durante la internalización de <i>Coxiella burnetii</i> .....	50
III.1.7 Relación de ezrina con la invasina de <i>Coxiella burnetii</i> OmpA.....	52
III.1.8 El receptor CD44 forma parte del proceso de internalización de <i>Coxiella burnetii</i> ..	54
III.2 Resultados del segundo objetivo específico .....	59
III.2.1 Ezrina no participa en la biogénesis de la vacuola que contiene a <i>Coxiella burnetii</i>	59
III.2.2 La sobreexpresión de ezrina no afecta la interacción de la vacuola que contiene a <i>Coxiella burnetii</i> con endosomas tardíos .....	61
III.2.3 Ezrina no interviene en la fusión de lisosomas con la Vacuola que contiene a <i>Coxiella burnetii</i> .....	63
Capítulo IV: Discusión, conclusiones y perspectivas .....	67
IV.1. Discusión .....	67
IV.2. Conclusiones .....	76
IV.3. Perspectivas .....	77
Capítulo V: Materiales y métodos .....	79
V.1. Reactivos y plásmidos .....	79
V.2. Cultivo celular .....	81
V.3. Propagación y purificación de <i>Coxiella burnetii</i> .....	82
V.4. Ensayos de internalización de <i>Coxiella burnetii</i> .....	83
V.5. Ensayos de biogénesis y maduración de la Vacuola que Contiene a <i>Coxiella burnetii</i> ....	84
V.6. Tinción con Faloidina Rodamina .....	84
V.7. Tratamiento con los inhibidores Y-27632 y blebistatina .....	84
V.8. Análisis del silenciamiento de ezrina por “Western blot” .....	85
V.9. Microscopía de fluorescencia y procesamiento de imágenes .....	85
V.10. Cuantificación de los parámetros analizados durante la internalización y la formación de la VCC .....	86
V.11. Análisis estadístico .....	86
Capítulo VI: Bibliografía .....	87

*Todo esto fue posible gracias al apoyo incondicional de muchas personas que aportaron de un modo u otro su ayuda y cariño para que finalmente se completara.*

*Quiero agradecer a muchas personas, pero primero que nada a vos Martí por estar a mi lado en cada momento de mi vida. Gracias por permitirme compartir todo con vos, por hacer mucho más hermosos los buenos momentos y más llevaderos los momentos difíciles. Te amo mi vida. Obviamente la felicidad es mejor si viene en combo con esa pequeña locura de cuatro patas que está siempre cerca para sacarnos una sonrisa, nuestro Juani hermoso.*

*Obviamente a mis “viejos” queridos, Mari y Raúl, que me apoyan en todo lo que hago y me dan una mano enorme siempre. Sin ellos esto no hubiera sido posible.*

*No me puedo olvidar de ese grupo de personas tan lindo con los que disfruté y seguiré disfrutando de momentos hermosos, La Familia. Porque siempre me apoyaron gracias hermanito querido (Mati), cuñas (Vicky, Agus, Mica y Juli), suegritos (Carlitos y Adri), los abuelos (Cata, Peti y Roberto), tíos (Andre, Chocho, Lucio, Fernando, Moni) y primos (Lu, Avri, Eze, Ema, Walter, Cesar, Guille y Cindi).*

*Al “Grupo” Cele, Vero, Rodi, Mati, y pequeño Valen, que se han convertido en la familia mendocina, con la que pasamos grandes momentos. Gracias por su amistad y por su apoyo incondicional.*

*A esos amigos locos que conocí junto con este bello deporte que es el agility. Gracias Estefi, Juli, Gabi, Santi y Martín por los lindos momentos y por ayudarme a despejar la mente con esas mañanas y tardes al aire libre.*

*A todos los compañeros del instituto (Mili, Lore, Pato, Mariana, Nadia, Santi, Caro, Neba, Rubén, Milton, Renata, Ceci, Celí, Euge, Coti, Esteban, Cristi, Anto) con quienes compartí mates, charlas y lindos momentos todo este tiempo. Son personas de las que aprendí muchísimo.*

*No quiero olvidarme de agradecer a quienes me permitieron hacer posible este trabajo y me enseñaron mucho en el proceso: a CONICET y todas las personas que forman parte este gran instituto (IHEM).*

*A pesar del poco tiempo que estuve con ellos no quiero dejar de hacer este agradecimiento porque me permitieron tener una experiencia excelente durante mi primera pasantía. Gracias Matteo, Fernandé, Eric, Franc, Melanie, Karine y Jorge por permitirme aprender muchísimo en lo personal y laboral.*

*No pueden faltar en este agradecimiento “El jefe”, aunque no te convence que te digamos así, muchas gracias Walter por toda tu ayuda durante todo este camino. También te quiero agradecer por abrirme las puertas del laboratorio y confiar en mí. Gracias por enseñarme que la ciencia no son solo logros sino un camino a transitar en el que se viven experiencias y se puede conocer a grandes personas.*

# CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

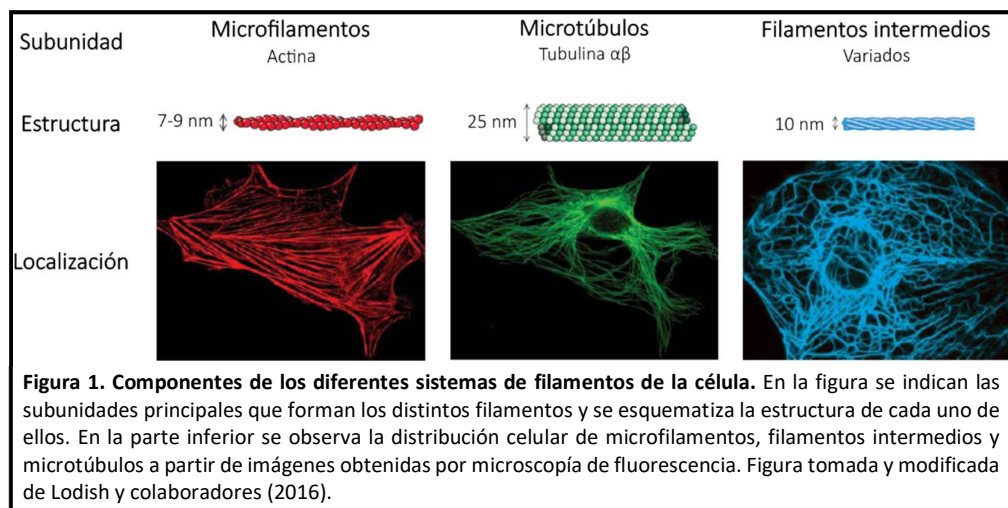
## I.1 El citoesqueleto

El citoesqueleto es una red tridimensional proteica que se despliega en toda la célula y que participa en diferentes funciones celulares. La característica principal que le permite formar parte de procesos tan diversos es su dinámica. La dinámica está definida por los procesos de polimerización y despolimerización de las diferentes subunidades que conforman sus tres sistemas principales (figura 1):

- **Microtúbulos.** Son los filamentos de mayor diámetro (25 nm), conformados por una proteína denominada tubulina. La tubulina se puede presentar en 2 isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  que se asocian formando dímeros que conforman la subunidad de los microtúbulos (Nogales 2001). Los microtúbulos presenta un polo positivo, por donde principalmente crecen, y uno negativo por donde tienden a acortarse (Walker y col. 1988; Valiron y col. 2001). Se caracterizan por interactuar con una serie de proteínas denominadas proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs: “microtubule associated proteins”) (Wieczorek y col. 2015). Una de las funciones de este tipo de filamentos es mantener la distribución tridimensional de los compartimientos membranosos en el citoplasma como son el retículo endoplásmico y el aparato de golgi (Gelfand y Bershadsky 1991). Otra de sus funciones principales es el transporte intracelular, los microtúbulos actúan formando “caminos” en el citoplasma sobre los cuales transitan diferentes tipos de “cargos” tales como endosomas, fagosomas, vesículas de secreción, ribonucleoproteínas, etcétera (Vale 1987). Un grupo de proteínas denominas motoras como son dineinas y kinesinas, participan en el desplazamiento de los “cargos” dentro de la célula, empleando ATP como fuente energética (Hyman y Mitchison 1991; Howard y col. 1989). Otro proceso clave en el que participan los microtúbulos es la división celular (Lodish y col. 2016).
- **Filamentos intermedios.** Su nombre está dado por el diámetro medio (10 nm) entre los otros dos sistemas de filamentos (Ishikawa y col. 1968). Son estructuras muy resistentes a las fuerzas de tensión que puedan aplicarse sobre ellos. A diferencia de microfilamentos y microtúbulos, no muestran polaridad y las subunidades que los conforman no interaccionan con nucleótidos (Lodish y col. 2016). Son más heterogéneos que los otros dos sistemas de filamentos ya que su composición depende de la subunidad básica que

lo conforma la cual varía en función del tejido (Herrmann y col. 2007). En mamíferos existen seis clases principales de filamentos intermedios encargados de funciones específicas como: mantener la integridad de tejidos, organizar el sarcómero del músculo estriado, regular la estructura de axones y mantener la estructura del núcleo celular (Robert, Hookway y Gelfand 2016).

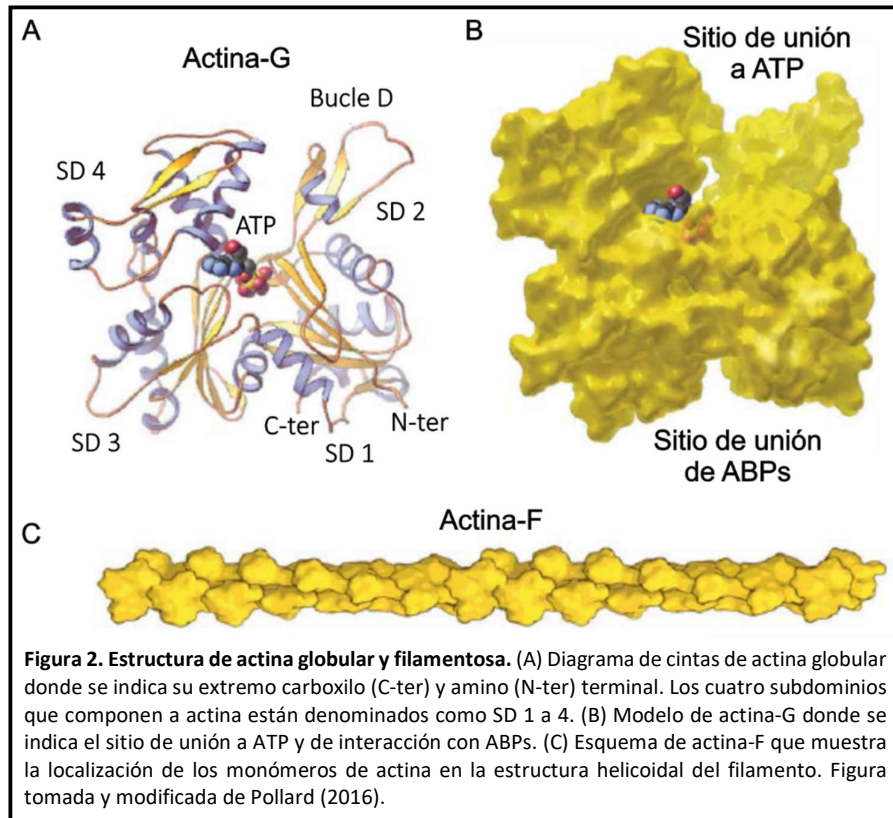
- **Microfilamentos.** Los filamentos de actina, en relación a los sistemas anteriores, tienen el menor diámetro, entre 7 a 9 nm. Están conformados por subunidades monoméricas repetidas de actina-G (actina globular). Forman un sistema muy dinámico que se extiende, principalmente, desde la membrana plasmática a través de todo el citoplasma. Además, este sistema de filamentos interacciona con la membrana mediante una compleja red de actina denominada corteza de actina. Los microfilamentos forma parte de procesos celulares muy diversos como: endocitosis, fagocitosis, movilidad y morfología celular, mitosis y citocinesis (Lodish y col. 2016).



Durante el desarrollo de este trabajo de tesis la mirada estará centrada en los microfilamentos de actina, profundizando diferentes conceptos como su estructura, dinámica, funciones y proteínas asociadas. Además, se explicará el rol que cumple el citoesqueleto de actina en el proceso endocítico y, en especial, en la fagocitosis de microorganismos intracelulares. Finalmente, todos estos conceptos nos permitirán interpretar los mecanismos involucrados en los procesos de internalización y tráfico intracelular de *Coxiella burnetii*.

### I.1.1 Estructura de la actina

Actina es una proteína conformada por una cadena polipeptídica simple de 375 aminoácidos y un peso molecular aproximado de 42 kDa (Elzinga y col. 1973). Es una de las proteínas más abundante en células eucariotas, representando en algunos casos el 10% o más de las proteínas totales (Pollard 2016). En mamíferos, se encuentran seis isoformas codificadas por genes diferentes. Se las clasifica en base a su punto isoeléctrico y a su distribución en los tejidos celulares. Las tres isoformas  $\alpha$  y una  $\gamma$  se expresan principalmente en tejidos musculares, mientras que las isoformas no musculares  $\gamma$  restante y  $\beta$  se distribuyen ubicuamente en los diferentes tejidos (Vandekerckhove y Weber 1978; Herman 1993). Considerando las características funcionales y estructurales, pueden diferenciarse dos formas de actina: actina-G o globular (monómero) y actina-F o filamentosa (polímero).



La estructura del monómero de actina (isoforma  $\alpha$  del músculo esquelético) se determinó por primera vez formando un complejo con la DNAsa I, en 1990 (Kabsch y col. 1990). El monómero de actina presenta dos lóbulos principales conocidos como pequeño o externo, y grande o interno (en referencia a su tamaño u orientación en el filamento). Dichos lóbulos están conectados por un

65 pequeño puente peptídico generado por el paso doble de la cadena de aminoácidos de actina  
66 (Kühn y Mannherz 2017). A su vez cada uno de estos dominios principales se divide en 2  
67 subdominios (SD 1-4). El sitio de unión de nucleótido (ADP o ATP) con cationes divalentes ( $Mg^{+2}$   
68 en condiciones fisiológicas) se encuentra en un surco profundo entre los SD 2 y 4 (Kudryashov y  
69 Reisler 2013). Por otro lado, la mayoría de las proteínas de unión a actina (ABPs) interaccionan con  
70 una ranura formada por residuos hidrofóbicos presentes entre SD 1 y 3 (Dominguez 2004). En el  
71 bucle D (“D-loop”) del subdominio SD 2, se encuentra el sitio de unión a DNAsa I el cual a su vez  
72 participa en la interacción entre monómeros de actina durante la polimerización (Kabsch y col.  
73 1990). Por último, en el SD 1 se encuentra el sitio de interacción principal con miosina (Behrmann  
74 y col. 2012).

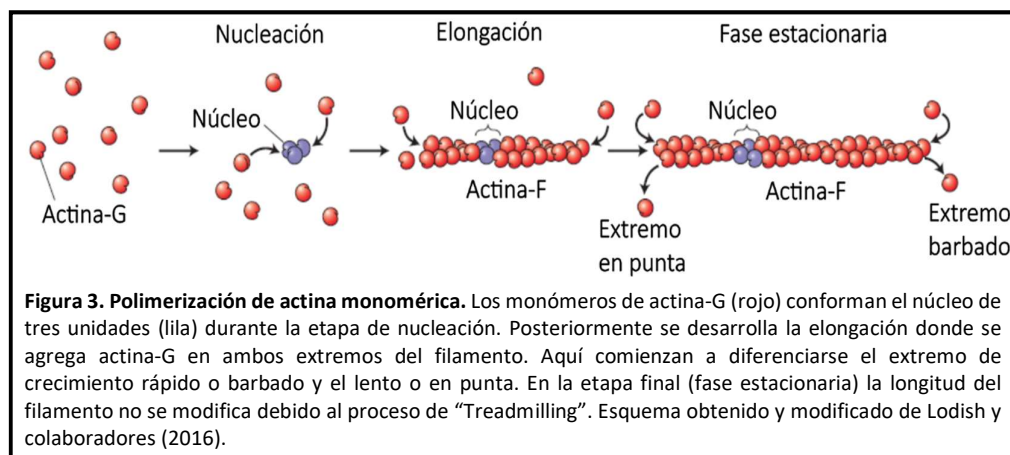
75 El filamento de actina tiene un diámetro de 7 a 9 nm y está formado por una doble hélice  
76 de actina-F. Es estructuralmente asimétrica ya que en sus extremos exponen diferentes regiones  
77 del monómero de actina. Dentro del filamento cada monómero interacciona con otras cuatro  
78 unidades de actina-G, dos de ellas forman parte de la misma hebra, mientras que las otras dos de  
79 la otra hebra. Las interacciones son de tipo hidrofóbicas y electrostáticas. La transición de actina-  
80 G a -F induce una inclinación de los lóbulos principales produciendo de esta manera la forma plana  
81 característica del filamento (Oda y col. 2009; Fujii y col. 2010). La estructura de ambas formas de  
82 actina y los diferentes sitios descritos previamente se esquematiza en la figura 2.

### 83 I.1.2 Dinámica de los filamentos de actina

84 La polimerización de filamentos de actina es un proceso que se puede dividir en forma  
85 esquemática en tres fases (*in vitro*) denominadas: nucleación, elongación y estacionaria (Lodish y  
86 col. 2016; Pollard 2016). La primera de ellas inicia con la formación del dímero de actina y el  
87 posterior agregado de la tercera unidad para formar el núcleo de actina. La cinética de la reacción  
88 es lenta debido a que estas estructuras son muy inestables hasta lograr el tamaño crítico de tres  
89 unidades (Sept y McCammon 2001). Luego de la nucleación comienza el proceso de elongación  
90 en donde, en etapas iniciales, se agregan monómeros de actina en ambos lados del núcleo.  
91 Posteriormente, el filamento comienza a mostrar polaridad pudiendo diferenciarse un polo con  
92 un crecimiento diez veces más rápido que el otro. Al extremo de elongación rápida se lo  
93 denominado barbado (“barbed end”) o positivo, y al lento se lo conoce como en punta (“pointed  
94 end”) o negativo (Kühn y Mannherz 2017). Durante la elongación los niveles de actina-G



disminuyen hasta llegar a un equilibrio con los de actina-F en desarrollo. A esta fase se la denomina estacionaria ya que la cantidad de actina-G que se agrega al filamento es igual a la que se libera por despolimerización (Lodish y col. 2016; Blanchoin y col. 2014). Se origina un desplazamiento continuo de subunidades que se denomina recambio rotatorio o “Treadmilling” en el que el tamaño del microfilamento se mantiene constante (Kühn y Mannherz 2017). El ATP presente en la actina-G, al formar parte del filamento, es hidrolizado de forma irreversible (Carlier y Pantaloni 1986) y esto estimula el mismo efecto en las moléculas vecinas (Korn y col. 1987). Sin embargo, este proceso no se da bajo un orden estricto sino que se produce al azar a lo largo del filamento actina como demostraron Jégou y colaboradores (2011). Finalmente, la actina-G liberada vuelve a intercambiar su nucleótido por ATP y el ciclo se desarrolla nuevamente. El proceso de polimerización de actina se encuentra esquematizado en la figura 3.

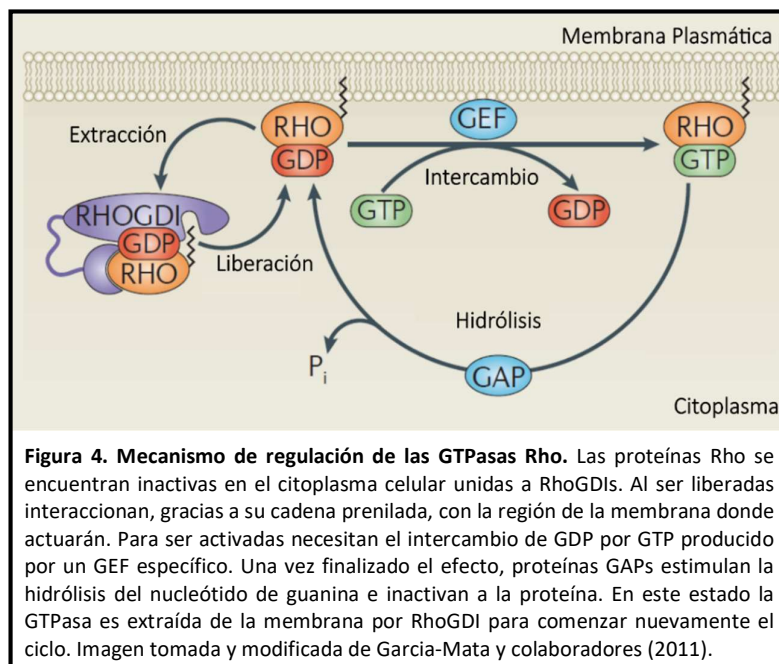


A nivel celular los fenómenos de polimerización y despolimerización de actina permiten la formación de una gran variedad de estructuras (lamelipodios, filopodios, fibras de estrés y adhesiones focales) (Nobes y Hall 1995; Burridge y Guilluy 2016) que regulan diversos procesos como: endocitosis (Qualmann y Mellor 2003), fagocitosis (Niedergang y Chavrier 2005), movilidad y morfología celular (Murali y Rajalingam 2014), mitosis y citocinesis (Chircop 2014).

### 1.1.3 Las GTPasas Rho: modulares del citoesqueleto de actina

La dinámica del citoesqueleto de actina es regulada principalmente por la familia de GTPasas Rho, la cual está compuesta por veinte proteínas que pueden dividirse en ocho subfamilias (Rho, Rac, Cdc42, RhoD/F, Rnd, RhoU/V, RhoH, y RhoBTB) (Boureux y col. 2007). Sus tres miembros mejor caracterizados RhoA, Rac1 y Cdc42 se encargan de organizar específicamente diferentes estructuras formadas por microfilamentos. De esta manera organizan

117 espacial y temporalmente el citoesqueleto para responder de forma rápida y precisa a estímulos  
 118 determinados. Un trabajo reciente, propone que la respuesta producida por la célula frente a un  
 119 estímulo depende de la naturaleza del mismo y la competencia que se produzca entre las  
 120 proteínas de unión a actina por el “pool” de actina monomérica. De esta manera, Arp2/3  
 121 (nucleador de actina desarrollado en I.1.4) produce microfilamentos ramificados frente a altos  
 122 niveles de actina-G y a un estímulo único sobre la membrana. Por otro lado, en caso de que se  
 123 produzcan múltiples estímulos o se registren bajas concentraciones de monómeros se activarán  
 124 principalmente forminas (polimerizador y nucleador de actina descrito en I.1.4) (Davidson y  
 125 Wood 2016). Normalmente en una célula en reposo, las proteínas Rho se encuentran en baja  
 126 concentración y, mayoritariamente, inactivas en el citoplasma. Un estímulo externo producirá su  
 127 activación y se anclarán a la membrana diana donde actuarán (Michaelson y col. 2001). Estas  
 128 GTPasas actúan a través de diversos efectores principalmente kinasas y proteínas de unión a  
 129 actina (ABPs: “Actin Binding Proteins”). Así, el efecto producido sobre el citoesqueleto dependerá  
 130 de la vía de señalización activada.



131 Las GTPasas Rho presentan diferentes niveles o modos de regulación y una compleja vía  
 132 de señalización en la célula eucariota. La regulación clásica de las proteínas Rho (figura 4) se da en  
 133 forma cíclica pasando de un estado activo, unido a GTP, a uno inactivo con GDP y viceversa. A  
 134 pesar de su nombre, estas proteínas tienen una baja actividad GTPasa por lo que necesitan de  
 135 proteínas GAPs (“GTPase activating proteins”) para producir la hidrólisis de GTP y su consecuente

136 inactivación. En el otro extremo se encuentran los GEFs (“Guanine nucleotide exchange factors”)  
137 que posibilitan el intercambio de GDP por GTP en las proteínas Rho (Cherfils y Zeghouf 2013). La  
138 distribución sub-celular de las GTPasas está organizada por modificaciones post-traduccionales  
139 como prenilaciones o palmitoilaciones que le permiten interaccionar con las membranas diana.  
140 Ciertas proteínas como los GDIs (“GDP dissociation inhibitors”) pueden evitar esta migración al  
141 secuestrar las GTPasas unidas a membrana y mantenerlas en el citoplasma celular impidiendo la  
142 disociación de GDP. Durante los últimos años diversos estudios han demostrado que las GTPasas  
143 se encuentran unidas a membrana o a GDIs en la célula. Esta relación no solo mantendría inactivas  
144 las proteínas Rho sino que también las protegería de su degradación (Rolli-Derkinderen y col.  
145 2005; Boulter y col. 2010).

146 Se han determinado nuevos modos de modulación de las GTPasas Rho por  
147 modificaciones covalentes como: fosforilación (Forget y col. 2002; Ellerbroek y col. 2003;  
148 Tkachenko y col. 2011; Takemoto y col. 2015; Guilluy y col. 2008; Kwon y col. 2000; Wei y col.  
149 2013), ubiquitinación (Oberoi y col. 2012; Deng y Huang 2014), AMPilación y transglutaminación  
150 (inducidas principalmente por factores de virulencias bacterianos) (Visvikis y col. 2010).

#### 151 I.1.4 Proteínas de unión a actina

152 Las proteínas de unión a actina son capaces de unir actina-G, actina-F o ambas al mismo  
153 tiempo. Pueden regular una gran variedad de actividades relacionadas al citoesqueleto de actina  
154 y en base a esto se clasifican en:

155 **Proteínas secuestradoras de actina:** Las representantes de este grupo son profilina y  $\beta$ -  
156 timosina. Son capaces de formar un complejo estable con actina-G/ATP, en una relación 1:1, e  
157 inhibir así su nucleación espontánea para mantener el “pool” de actina monomérica. A diferencia  
158 de  $\beta$ -timosina, los complejos generados por profilina pueden ser utilizados para el proceso de  
159 elongación de actina-F por el extremo barbado (Kühn y Mannherz 2017).

160 **Proteínas de nucleación y elongación de actina:** Como mencionamos anteriormente, *in*  
161 *vitro*, la nucleación es la etapa limitante en la formación del filamento de actina. Sin embargo, en  
162 el citoplasma, este proceso se encuentra regulado por tres grupos de proteínas: el complejo  
163 Arp2/3 (“Actin related proteins”), las forminas y los nucleadores de unión a monómeros en  
164 tándem (“Tandem-monomer-binding nucleators”). En general, el primero se encarga de la  
165 formación de ramificaciones sobre filamentos de actina preformados, mientras que los otros dos

166 producen elongaciones de actina-F lineal (Pollard 2016). El complejo Arp2/3 es capaz de  
167 interaccionar lateralmente con actina-F y actuar como base o plataforma para el desarrollo de una  
168 ramificación de actina sobre el filamento principal preformado (Rouiller y col. 2008). Para  
169 potenciar su actividad nucleadora necesita interactuar con factores promotores de la nucleación.  
170 Estas moléculas presentan en su carboxilo terminal (C-ter) una región denominada VCA con un  
171 sitio de unión de actina monomérica (dominio WH2 o V) y uno para interaccionar con Arp2/3 (en  
172 los dominios conector C y ácido A). Los más estudiados son: WASP (“Wiskott-Aldrich syndrome  
173 protein”), N-WASP (WASP neuronal), WAVE/SCAR (“WASP-family verprolin-homologous  
174 protein”), WASH (“Wiskott-Aldrich Syndrome Protein and SCAR Homologue”) y WHAMM (“WASP  
175 homologue-associated protein with actin, membranes and microtubules”) (Suetsugu 2013).

176 A diferencia de Arp2/3, las forminas tiene una actividad dual produciendo nucleación y  
177 elongación de filamentos de actina. Actúan como un homodímero que se une, a través de sus  
178 dominios FH2 (“formin homology 2”), al extremo barbado de la actina-F y lo protege de las  
179 proteínas de recubrimiento. Luego, se desplaza a lo largo del filamento agregando monómeros  
180 de actina provistos por regiones ricas en prolinas presentes en los segmentos FH1 (“formin  
181 homology 1”) de la formina. Los miembros más conocidos son: mDia1 y mDia2 (“mammalian  
182 diaphanous 1 y 2”) (Chesarone y col. 2010).

183 Finalmente, el grupo de nucleadores de unión a monómeros en tándem es el que se  
184 encuentra menos estudiado. Está compuesto por moléculas más heterogéneas que los anteriores  
185 como: Spire, Cobl (“cordon-bleu”), Lmod (“leiomodin”), JMY (“junction mediating regulatory  
186 protein”) y APC (“adenomatous polyposis coli”). Todos sus miembros tienen pequeños dominios  
187 WH-2 consecutivos que facilitan la formación de núcleos de actina (Dominguez y Holmes 2011;  
188 Firat-karalar y Welch 2012).

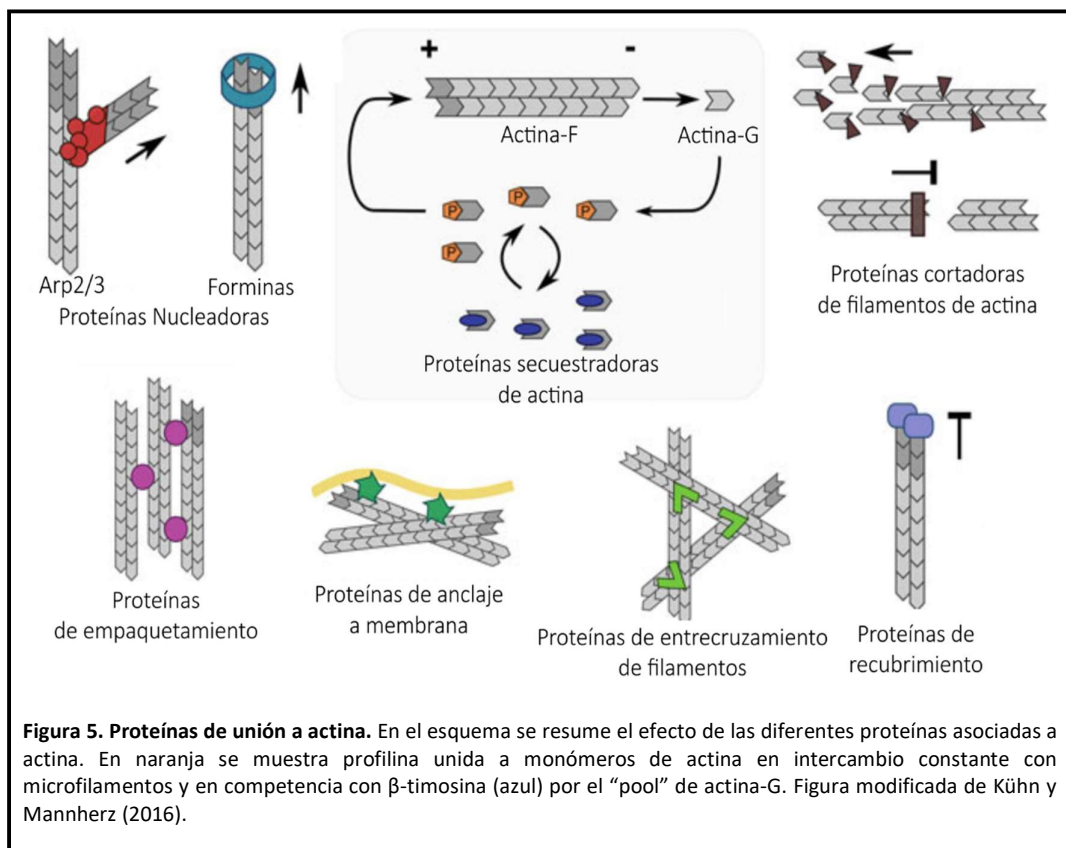
189 **Proteínas de recubrimiento:** Son heterodímeros con una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ , capaces  
190 de unirse al extremo barbado de un filamento e inhibir el agregado de monómeros de actina. Se  
191 encuentran constitutivamente activas y son reguladas de manera indirecta mediante  
192 competencia con forminas por el extremo de filamentos de actina en crecimiento. También  
193 pueden ser reguladas directamente por la interacción con fosfatidilinositoles o ciertas proteínas  
194 (M. Edwards y col. 2014).

195 **Proteínas cortadoras de filamentos:** Son encargadas de despolimerizar actina-F y así  
196 regular la dinámica de los microfilamentos. Se clasifican en dos familias principales conocidas

197 como cofilinas y gelsolinas. Las cofilinas interaccionan con mayor afinidad con actina-G-ADP  
 198 presente en los filamentos para lograr la despolimerización. Las proteínas de esta familia son  
 199 inhibidas principalmente por la fosforilación de su residuo serina 3. Por otro lado, las gelsolinas no  
 200 solo cortan los filamentos de actina, sino que también bloquean los nuevos extremos barbados  
 201 formados. Son reguladas por los niveles de calcio celular (Pollard 2016).

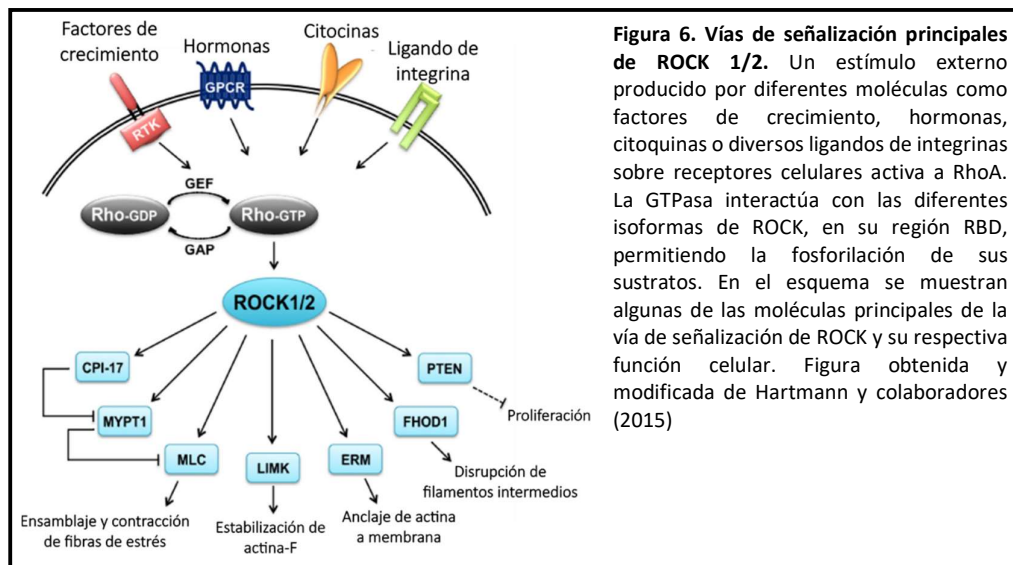
202 **Proteínas de entrecruzamiento o empaquetamiento:** La función principal de estas  
 203 proteínas es formar redes complejas o paquetes de filamentos de actina. Todos los miembros  
 204 tienen dos dominios de unión a actina-F (ABDs: “actin-binding domains”) y la distancia entre ellos  
 205 determinará las características de las estructuras formadas. Proteínas como fascina,  $\alpha$ -actinina y  
 206 fibrina forman fibras paralelas empaquetadas (tienen ABD cercanos) mientras que filamina  
 207 produce redes desorganizadas (tienen ABD separados). Dentro de este grupo también se  
 208 encuentran las proteínas de anclaje, como  $\alpha$ -actinina, vinculina, talina y las ERM (ezrina radixina y  
 209 moesina), que permiten la interacción de filamentos de actina con estructuras celulares  
 210 membranosas (Stevenson y col. 2012; Pollard 2016; Kühn y Mannherz 2017).

211 Todas las proteínas mencionadas anteriormente se ejemplifican en la figura 5.



## 212 I.1.5 La vía de señalización de RhoA/ROCK

213 RhoA, una de las GTPasas mejor caracterizadas de la familia Rho, es capaz de coordinar  
 214 de forma eficiente la dinámica del citoesqueleto de actina principalmente a través de las forminas  
 215 mDía y su efector ROCK ("Rho-associated coiled-coil kinases"). Este último es una serina/treonina  
 216 kinasa que presenta solo dos isoformas, denominadas ROCK I y II, las cuales se expresan  
 217 ubicuamente en células eucariotas. La primera de ellas se encuentra en forma mayoritaria en  
 218 pulmón, hígado y riñones, mientras que ROCK II en cerebro y tejido muscular (Morgan-Fisher y  
 219 col. 2013). Estructuralmente, presentan un dominio catalítico con actividad kinasa en su extremo  
 220 N-terminal, seguido por un dominio de unión a RhoA (RBD) y en el segmento C-terminal un  
 221 dominio de unión a lípidos (PH) interrumpido por una región rica en cisteínas (CRD) (Wen y col.  
 222 2008). La interacción de los segmentos RBD y CRD con el dominio catalítico de la kinasa produce  
 223 el efecto autoinhibitorio que regula a ROCK (M. Amano y col. 1999). La activación se produce por  
 224 interacción de RhoA-GTP con la región RBD (Ishizaki y col. 1996) o de ciertos lípidos como ácido  
 225 araquidónico o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) con el dominio PH de la kinasa (Feng y col.  
 226 1999; Yoneda y col. 2005). Un estudio reciente identificó 121 posibles sustratos de ROCK en células  
 227 humanas (Nishioka y col. 2012), sin embargo los más estudiados y con mayor importancia en  
 228 relación a la regulación del citoesqueleto de actina son la cadena liviana de miosina (MLC) y su  
 229 fosfatasa (MLCP), las kinasas LIM (LIMK) y las proteínas ezrina, radixina y moesina (ERM) (Morgan-  
 230 Fisher y col. 2013). Algunos de los sustratos de ROCK y su mecanismo de activación se muestran  
 231 en la figura 6.



**Figura 6. Vías de señalización principales de ROCK 1/2.** Un estímulo externo producido por diferentes moléculas como factores de crecimiento, hormonas, citoquinas o diversos ligandos de integrinas sobre receptores celulares activa a RhoA. La GTPasa interactúa con las diferentes isoformas de ROCK, en su región RBD, permitiendo la fosforilación de sus sustratos. En el esquema se muestran algunas de las moléculas principales de la vía de señalización de ROCK y su respectiva función celular. Figura obtenida y modificada de Hartmann y colaboradores (2015)

## 232 I.1.6 Miosinas

233 Las miosinas son motores moleculares que utilizan como fuente energética ATP para  
234 producir fuerza y generar tensión sobre los microfilamentos. En células no musculares existen dos  
235 clases, denominadas miosina no muscular tipo I (MNM I) y II (MNM II). El complejo motor de  
236 miosina II es un hexámero conformado por 2 cadenas pesadas (MHCs), 2 cadenas livianas  
237 regulatorias (RLCs) y 2 cadenas livianas esenciales (ELCs) (Betapudi 2014). Cada MHCs, a su vez,  
238 está constituida por cuatro segmentos bien diferenciados en estructura y función: una cabeza  
239 globular con actividad ATPasa que interacciona con actina, un cuello con dos motivos IQ  
240 ("calmodulin-binding motif") con los que interaccionan las cadenas livianas, una región helicoidal  
241 que permite la conexión de MHCs y un extremo C-terminal pequeño que regula la distribución  
242 subcelular (Sandquist y Means 2008; Vicente-Manzanares y col. 2009). La MNM II puede  
243 encontrarse en un estado compacto (10S) producido por la interacción del extremo C-terminal de  
244 la MHC con la RLC. Esta forma tiene baja actividad catalítica y mayor afinidad por ADP + P<sub>i</sub> (fosfato  
245 inorgánico). El estado activo (6S) se encuentra desplegado debido a la fosforilación de la RLC  
246 producida principalmente por ROCK o MLCK (Dulyaninova y Bresnick 2013). Los complejos de  
247 MNM II activos interaccionan para formar las fibras de miosina que producirán la fuerza mecánica  
248 en células no musculares a través de su relación con el citoesqueleto de actina. Este complejo  
249 conocido como actomiosina participa en procesos celulares como mantenimiento de la  
250 morfología, movilidad, división celular (Aguilar-Cuenca y col. 2014), formación de la copa fagocítica  
251 (M Olazabal y col. 2002), entre otros.

## 252 I.1.7 Las kinasas LIM

253 La familia de kinasas LIM está compuesta solo por dos miembros: LIM kinasa I (LIMK I) y  
254 LIM kinasa II (LIMK II) (Mizuno y col. 1994; Okano y col. 1995). Sus estructuras son muy similares  
255 entre sí. Está formada por dos dominios LIM en su extremo N-terminal, seguido por una secuencia  
256 PDZ, una región rica en prolina/serina y, en su extremo C-terminal, reside la actividad kinasa  
257 (Manetti 2012). Las LIMKs se encuentran en diferente ubicación a nivel subcelular. LIMK I se  
258 localiza principalmente en adhesiones focales junto a filamentos de actina. LIMK II, en cambio,  
259 tiene una distribución citosólica presentando un patrón punteado similar a endosomas y se  
260 encuentra relacionada al aparato de Golgi (Acevedo y col. 2006). Ambas kinasas se encuentran  
261 inactivas por interacción de sus dominios LIM y PDZ con la región catalítica (Manetti 2012). Su

262 activación depende de la fosforilación de un residuo treonina (508 en LIMK I y 505 en LIMK II)  
263 producida fundamentalmente por efectores de las GTPasas Rho como PAK1/4 (Edwards y col.  
264 1999; Dan y col. 2001), ROCK (Sumi y col. 2001) y MRCK $\alpha$  (Sumi y col. 2001). Las LIMKs tienen  
265 actividad serina/treonina kinasa y sus sustratos principales son los tres miembros de la familia de  
266 cofilinas. Estas últimas se inactivarán tras la fosforilación de su residuo serina 3 generando, como  
267 consecuencia, en la célula una acumulación de actina filamentosa (Kanellos y Frame 2016).

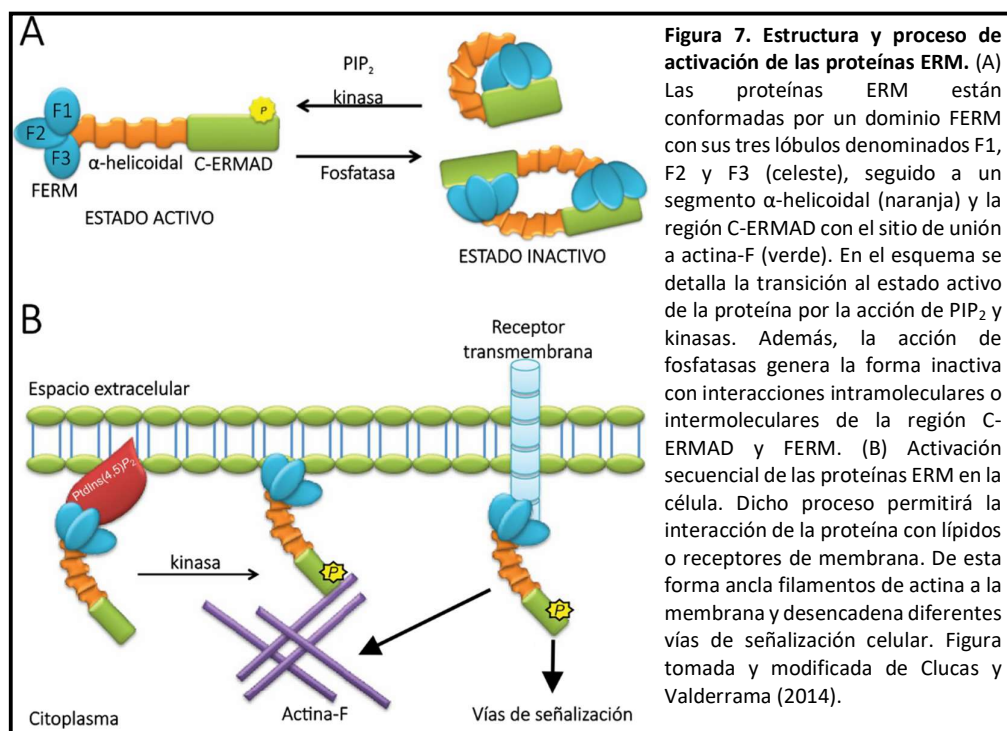
## 268 I.1.8 Las proteínas ERM

269 La familia de proteínas ERM, como sus siglas lo indican, está formada por tres miembros  
270 conocidos como ezrina, radixina y moesina. Ezrina fue aislada en 1983 como una proteína de 80  
271 kDa ampliamente distribuida en células no musculares y enriquecida en estructuras de membrana  
272 como “blebs” (prominencias en forma de burbuja), microvellosidades y fibras de actina (Bretscher  
273 1983). En 1989, se determinó la presencia de una proteína de 82 kDa en contactos focales y  
274 celulares a la cual se denominó radixina (Tsukita y col. 1989). Dos años después se describió a  
275 moesina como una molécula de 77 kDa con actividad similar a las anteriores (Lankes y Furthmayr  
276 1991).

277 Las proteínas ERM tienen en su estructura un dominio FERM (“Four point one ERM”), en  
278 su extremo N-terminal, el cual posibilita la interacción con lípidos fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato  
279 (PIP<sub>2</sub>) o proteínas de membrana (principalmente receptores). Por otro lado, en su extremo C-  
280 terminal se encuentra el dominio de unión a actina-F (C-ERMAD). Entre ambos dominios se  
281 encuentra un segmento  $\alpha$ -helicoidal (Fehon y col. 2010; Pore y Gupta 2015). En su estado inactivo,  
282 adopta una estructura plegada por interacciones entre la región  $\alpha$ -helicoidal y C-ERMAD con el  
283 dominio FERM (Ponuwei 2016). Interesantemente, al estudiar la estructura del dominio FERM de  
284 moesina y radixina se observó que en su forma inactiva o latente la proteína tiene todos sus sitios  
285 de interacción enmascarados, sin embargo, son capaces de interaccionar con la cabeza polar de  
286 PIP<sub>2</sub> (Hamada y col. 2000; Pearson y col. 2000). En la célula, las proteínas ERM son activadas en  
287 dos etapas secuenciales (Fievet y col. 2004). En primera instancia la unión a PIP<sub>2</sub> genera cambios  
288 conformacionales que desbloquean el segmento C-ERMAD temporalmente. Luego, se fosforila  
289 un residuo treonina (567, 564 y 558 en ezrina, radixina y moesina, respectivamente) presente en  
290 la región C-terminal lo que estabiliza su forma desplegada y activa (Yonemura y col. 2002; Fievet y  
291 col. 2004). Además, se ha observado que mutantes de ezrina que no pueden interaccionar con



292 PIP<sub>2</sub> no son fosforiladas en la treonina ubicada en la posición 567 (Fievet y col. 2004). La  
 293 fosforilación de dicho residuo puede ser catalizada por diversas kinasas como ROCK (Nakamura y  
 294 col. 2000; Oshiro y col. 1998), NIK ( "Nck-interacting kinase") (Baumgartner y col. 2006), GRK2 ( "G  
 295 protein-coupled receptor kinase 2") (Cant y Pitcher 2005), PKC ( "protein kinase C") (Liu y col.  
 296 2013), entre otras. Las proteínas ERM, además pueden sufrir fosforilación en su segmento N-  
 297 terminal (residuos de ezrina S66, Y145 y T235) o en su región α-helicoidal (Y353/4 y T477), sin  
 298 embargo, el rol biológico de estas modificaciones no ha sido caracterizado. Por otro lado, se  
 299 conoce muy poco aún sobre las fosfatasa implicadas en la desfosforilación de residuo 567, 564 y  
 300 558 de las proteínas ERM. Solo la fosfatasa de miosina ha sido claramente implicada en dicho  
 301 proceso y se han sugerido como otros posibles candidatos a PP2A ("Protein phosphatase 2A") y  
 302 PP2C ("Protein phosphatase 2C") (Hishiya y col. 1999; Canals y col. 2012). La estructura y el proceso  
 303 de activación de las ERM se esquematizan en la figura 7.



304 En el caso específico de ezrina, como se menciona previamente, se encuentra en una  
 305 amplia variedad de células epiteliales y, a nivel subcelular, se distribuye entre el citoplasma y  
 306 estructuras de membrana enriquecidas en actina (Berryman y col. 1993). Su función principal es  
 307 estructural, permitiendo la interacción de la corteza de actina con la membrana plasmática a  
 308 través de PIP<sub>2</sub>. En relación a dicha conexión, trabajos recientes establecen a ezrina como el  
 309 regulador fundamental de la tensión de la membrana plasmática en células epiteliales (Brückner

310 y col. 2015). Es por ello que participa en diversos procesos celulares a nivel de la membrana  
311 plasmática. Sin embargo, no cumple simplemente una función estructural, sino que también,  
312 debido a su interacción con receptores y proteínas adaptadoras de membrana, participa en varias  
313 vías de señalización celular. Diversos estudios han demostrado su interacción con receptores  
314 implicados en la adhesión y movilidad celular como CD44, ICAM-1/2 (Legg y Isacke 1998; Heiska y  
315 col. 1998); transportadores de iones (NHE-1) (Poulet y col. 2001); proteínas adaptadoras como  
316 EBP50 (Poulet y col. 2001); moléculas de la vía de señalización de las GTPasas Rho como RhoGDIs  
317 y Dbl (Takahashi y col. 1997; Prag y col. 2007); proteína kinasa de adhesiones focales (FAK) (Poulet  
318 y col. 2001).

319 Las proteínas ERM participan en una gran variedad de actividades celulares entre las  
320 cuales se destaca la fagocitosis. Diakonova y colaboradores (2002) demostraron que ezrina se  
321 encuentra presente en etapas tempranas de la formación del fagosoma. También se ha  
322 observado que las proteínas ERM permiten el ensamblaje de actina en la membrana de dicho  
323 compartimiento (Defacque y col. 2000). Además, diferentes trabajos determinaron que son  
324 capaces de regular la maduración de fagosomas y su fusión con lisosomas (Marion y col. 2011;  
325 Erwig y col. 2006). En relación al proceso fagocítico de bacterias, ezrina participa en la adhesión  
326 y/o entrada de *Shigella flexneri* (Skoudy y col. 1999; Tran Van Nhieu y col. 2000), *Chlamydia*  
327 *trachomatis* (Swanson y col. 2007) y *Escherichia coli* (Korotkova y col. 2008) en células epiteliales,  
328 *Brucella abortus* en trofoblastos (Watanabe y col. 2009), y *Neisseria meningitidis* en células  
329 endoteliales (Eugène y col. 2002).

## 330 1.2 La vía endocítica

331 La corteza ("cortex") de actina es la estructura principal del citoesqueleto de actina  
332 implicada en varios fenómenos que se desarrollan a nivel de la membrana plasmática. Esta es una  
333 red o malla de microfilamentos que se encuentra inmediatamente por debajo de la membrana  
334 plasmática de la célula. La comunicación entre la corteza de actina y la membrana, a través de las  
335 GTPasas Rho y sus proteínas asociadas, es fundamental para el desarrollo de diversos procesos  
336 celulares como: endocitosis (Dai y col. 1997; Boulant y col. 2011), exocitosis (Lee y Knecht 2002),  
337 fagocitosis (Masters y col. 2013) y macropinocitosis (Falcone y col. 2006; Kruth y col. 2005).  
338 Específicamente en el proceso endocítico, la corteza de actina participa principalmente en la  
339 organización de los dominios de membrana, así como también en la formación y cierre de las  
340 copas e invaginaciones de la membrana (de Curtis y Meldolesi 2012).

341 La endocitosis puede definirse como un conjunto de eventos a partir de los cuales fluidos,  
342 solutos, componentes de membrana y diversas partículas (virus, bacterias o células apoptóticas)  
343 son internalizados en la célula. Todos estos fenómenos se inician a nivel de la membrana  
344 plasmática como invaginaciones que luego se escinden para formar vesículas en el citoplasma  
345 celular. Estas vesículas, en condiciones fisiológicas normales, seguirán un proceso de maduración  
346 clásico que involucra: disminución del pH luminal, modificaciones en las concentraciones de los  
347 fosfatidilinositoles de membrana e intercambios de diferentes proteínas entre ellas GTPasas Rab  
348 (Huotari y Helenius 2011; Scott y col. 2014).

349 El proceso endocítico puede ser clasificado de diferentes maneras en base a las  
350 características y la morfología de las vesículas formadas, la maquinaria proteica implicada, la  
351 naturaleza de la sustancia internalizada, el tipo de lípidos de membrana involucrado. En este  
352 trabajo se describe cada uno de los tipos de endocitosis en forma general (figura 8) y se hará foco  
353 en la fagocitosis analizándola detalladamente.

354 Tradicionalmente se ha clasificado a la vía endocítica en:

355 **Endocitosis mediada por clatrina (EMC).** En forma simplificada podemos dividirlo en 5  
356 etapas: nucleación, selección de la molécula “carga”, ensamblaje de la cubierta, escisión y pérdida  
357 de la cubierta. El proceso comienza con el reclutamiento de proteínas de nucleación FCHO (“FCH  
358 domain only”), EPS15 (“EGFR pathway substrate 15”) e intersectinas que inician la curvatura de la  
359 membrana en sitios específicos. Esto permite la llegada del complejo AP2 (“Adaptor protein 2”) y  
360 otras proteínas adaptadoras específicas que seleccionan el “carga” o receptor a endocitar.  
361 Posteriormente, estas moléculas reclutan clatrina a la membrana y permiten su ensamblaje para  
362 formar una cubierta que estabiliza la curvatura en progreso (“clathrin-coated pit”). En una cuarta  
363 etapa se produce el reclutamiento de proteínas denominadas dinaminas en el “cuello” de la  
364 vesícula en formación (único punto de contacto con la membrana) lo que genera la fisión de la  
365 misma y su liberación al citoplasma. Un estudio reciente indicó que este proceso sería precedido  
366 y regulado por la polimerización de actina en el sitio de endocitosis (Grassart y col. 2014).  
367 Finalmente, la cubierta de clatrina es removida por el accionar de la proteína HSP70 (“heat shock  
368 cognate 70”) y su cofactor auxilina. La vesícula “desnuda” continuará su camino por la vía  
369 endocítica desembocando en la degradación o reciclaje a membrana de la molécula “carga”  
370 (McMahon y Boucrot 2011). La función principal de este tipo de endocitosis es la internalización  
371 de receptores y ciertos nutrientes como hierro y colesterol. El proceso se puede desarrollar de

372 forma constitutiva (Liu y col. 2010) o bien de manera inducible frente a algún estímulo (Sigismund  
373 y col. 2008). Esta vía también es aprovechada por toxinas bacterianas (tetánica, shiga, diftérica y  
374 del ántrax) como puerta de ingreso a la célula (Deinhardt y col. 2006; Abrami y col. 2003; Morris y  
375 col. 1985; Sandvig y col. 1989). La EMC es un proceso que muestra una dependencia de actina  
376 muy variable (Lamaze y col. 1997; Fujimoto y col. 2000; Saffarian y col. 2009). Sin embargo,  
377 estudios recientes han demostrado que la tensión de la membrana plasmática producida por el  
378 citoesqueleto es importante (Boulant y col. 2011).

379 **Endocitosis mediada por caveola (EMCav).** Su nombre deriva de una familia de proteínas  
380 denominadas caveolinas que son fundamentales en el proceso. Las caveolinas son proteínas  
381 integrales de membrana capaces de interaccionar con regiones ricas en colesterol presente en la  
382 membrana plasmática como las “balsas lipídicas” (“lipid rafts”). Se cree que forman estructuras  
383 estáticas que producen la vesícula frente a un estímulo sobre el receptor a endocitar (Parton y  
384 Simons 2007). La estructura membranosa formada se denomina caveola (del latín “pequeña  
385 cueva”) con un tamaño que ronda los 50 a 100 nm (Parton y Simons 2007). Sin embargo, para que  
386 este tipo de endocitosis se produzca se requiere de otras dos proteínas de gran importancia en el  
387 proceso. La primera de ellas es cavina-1, una molécula citoplasmática de recubrimiento que  
388 interacciona de forma directa con caveolina-1 y estabiliza la invaginación en progreso (Hill y col.  
389 2008). Para que el ingreso a la célula termine y se libere la caveola al citoplasma se necesita, al  
390 igual que en la EMC, el accionar de dinamina que escindirá la vesícula de la membrana (Hill y col.  
391 2008). Una amplia variedad de patógenos bacterianos como: *Pseudomonas aeruginosa*,  
392 *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* y *Rickettsia*  
393 *conorii* emplean caveolinas en su ingreso a la célula hospedadora (Hill y col. 2008).

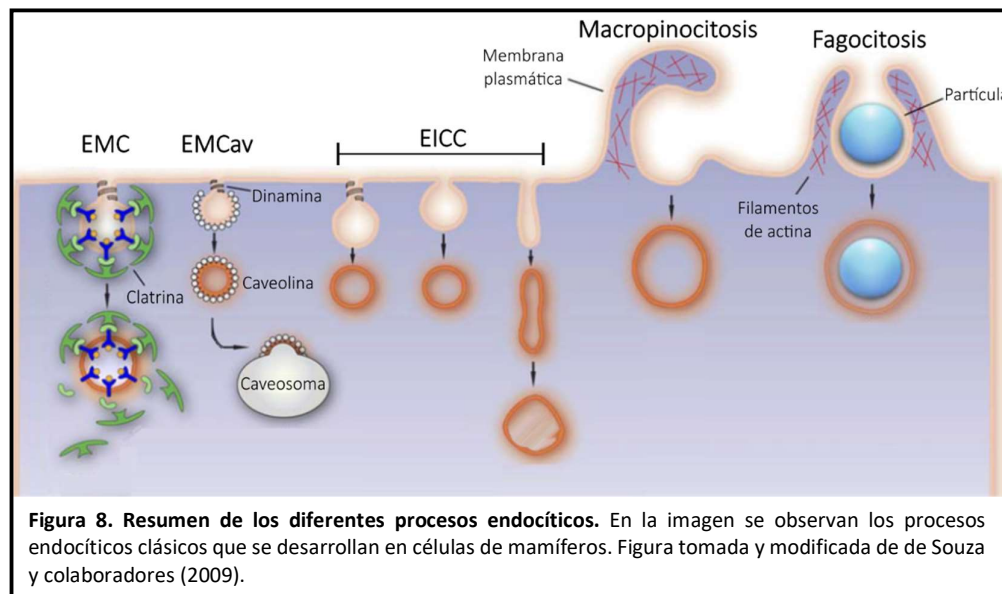
394 **Endocitosis independiente de clatrina y caveola (EICC).** Conformado por un grupo  
395 creciente de procesos que aún se encuentran en intenso estudio. Comúnmente estas vías se  
396 clasifican en base a su regulador principal pudiendo diferenciarlas como: endocitosis  
397 dependientes de flotilinas, de Arf6, de RhoA o de GRAF1 (“GTPase regulator associated with focal  
398 adhesion kinase-1”). Todas ellas tienen ciertas características en común y algunas diferencias. En  
399 general estos procesos son independientes de clatrina o caveolina y se desarrollan en regiones de  
400 la membrana ricas en colesterol (“Lipid rafts”) como la EMCav. La importancia de dinamina en  
401 cada vía aún se encuentra bajo discusión y hasta el momento solo participaría en la endocitosis  
402 mediada por RhoA. Por otro lado, las diferencias más importantes que permiten identificar estos

403 procesos se concentran principalmente en las pequeñas GTPasas y kinasas que los gobiernan y en  
404 la morfología de las invaginaciones y vesículas producidas e (Hansen y Nichols 2009; El-Sayed y  
405 Harashima 2013).

406       **Macropinocitosis.** Es un proceso que comienza con la formación de grandes  
407 prominencias de la membrana plasmática que luego colapsan nuevamente sobre sí mismas  
408 capturando en su interior principalmente fluidos. Las prominencias de membrana formadas  
409 dependen de PI5K I ("phosphoinositide-5-kinase I") y su escisión de PI3K I ("phosphoinositide-3-  
410 kinase I"). Los macropinosomas formados son de tamaño muy variable entre 0.2 a 5.0  $\mu\text{m}$   
411 (Bohdanowicz y Grinstein 2013). Otro factor sumamente importante en la macropinocitosis es el  
412 citoesqueleto de actina ya que se ha observado que dicho proceso se inhibe en células tratadas  
413 con Citocalasina D o Latrunculin A, agentes que despolimerizan filamento de actina (Buccione y  
414 col. 2004). La presencia de actina en la macropinocitosis se debe a la actividad de diferentes  
415 factores promotores de la nucleación como N-WASP, WAVE-1 y WAVE-2 y nucleadores como el  
416 complejo Arp2/3 (Legg y col. 2007; Itoh y Hasegawa 2013). Como se menciona previamente, la  
417 activación de muchas de estas proteínas es orquestada por las diferentes GTPasas Rho (Croisé y  
418 col. 2014). La macropinocitosis puede ser inducida por el estímulo de ciertos factores de  
419 crecimiento como PDGF ("platelet derived growth factor"), EGF ("epidermal growth factor") y  
420 VEGF ("vascular endothelial growth factor") en células epiteliales y fibroblastos (Bretscher y  
421 Aguado-Velasco 1998; Kurokawa y col. 2004). En muchos casos es empleada para redistribuir  
422 receptores (a factores de crecimiento e integrinas) en la membrana o disminuir su presencia (Gu  
423 y col. 2011). También se ha observado que en macrófagos y células dendríticas la macropinocitosis  
424 se produce en forma constitutiva para captar determinantes antigénicos y mantener constante  
425 los niveles de presentación de presentación de antígenos (Bohdanowicz y col. 2013).  
426 Interessantemente, el LPS (lipopolisacárido) de bacterias Gram negativas puede inducir la  
427 macropinocitosis que a su vez incrementará los niveles de fagocitosis mediada por complemento  
428 (Luo y col. 2014; Patel y Harrison 2008). Esto demuestra la íntima relación que puede existir entre  
429 diversos procesos endocíticos.

430       **Fagocitosis.** Es el mecanismo por el cual se internalizan partículas de un tamaño mayor a  
431 0.5  $\mu\text{m}$ . La naturaleza de la partícula a fagocitar puede variar desde un pequeño microorganismo  
432 hasta células apoptóticas. La fagocitosis es un proceso específico ya que para desarrollarse  
433 necesita que la partícula o "presa" interaccione con receptores específicos de membrana. Luego

del reconocimiento, se activan vías de señalización reguladas por diferentes GTPasas Rho que modifican el citoesqueleto de actina en la zona de contacto. El receptor implicado y el tipo de célula fagocítica (profesional o no profesional) determinan cuáles serán las GTPasas implicadas en dicho proceso.



### 1.2.1 El proceso fagocítico

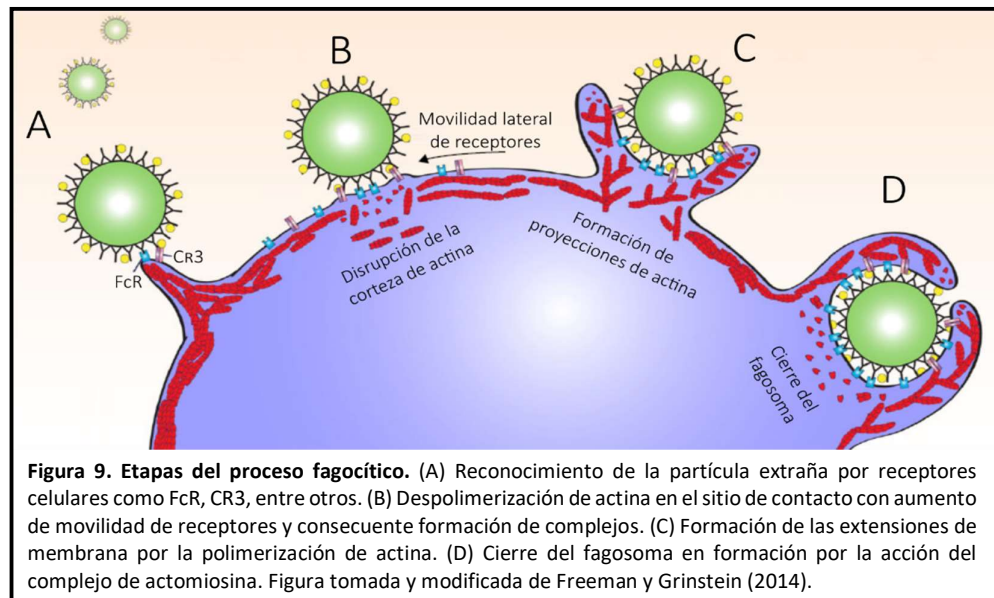
El proceso fagocítico depende, principalmente en sus etapas iniciales, de la dinámica del citoesqueleto de actina. Esto se evidencia por el efecto inhibitorio que ejercen agentes que afectan la polimerización de actina-F como Citocalasina D o Latrunculina A (Kaplan 1977; de Oliveira y Mantovani 1988). Teniendo en cuenta el comportamiento dinámico del citoesqueleto de actina durante el proceso fagocítico, se pueden diferenciar cuatro etapas (figura 9). En la primera de ellas se produce el reconocimiento de la partícula “extraña” por receptores a Fc (FcR), lectinas tipo C e integrinas  $\alpha_M\beta_2$ , entre otros. Los FcR son capaces de interactuar con partículas opsonizadas (cubiertas) con inmunoglobulinas a través de sus fracciones Fc (Le Cabec y col. 2002). En el otro extremo se encuentran las lectinas tipo C, como Dectina-1, que pueden interactuar directamente con glucanos, quitina, glicoproteínas presentes, principalmente, en la pared celular de hongos (Urso y col. 2016; Brown y col. 2002). El punto medio está representado por las integrinas  $\alpha_M\beta_2$  o receptores a complemento tipo 3 (CR3) que pueden interactuar con partículas opsonizadas con moléculas iC3b y no opsonizadas (Le Cabec y col. 2002).

Otro grupo de moléculas claves en la fagocitosis son los co-receptores que tienen un papel sumamente importante regulando y preparando la respuesta fagocítica para que se desarrolle de

454 forma eficiente. Las actividades que llevan a cabo se pueden resumir en: aumentar la movilidad  
455 de receptores fagocíticos (Cairo y col. 2006), permitir que se expongan sitios de mayor afinidad en  
456 integrinas e incluso estabilizar dicho estado (activación “inside-out”) (Fujisaki y col. 1999; Lee y col.  
457 2008; Chung y col. 2014) y estimular la formación de protrusiones de membrana que facilitan la  
458 “captura” del ligando (Patel y Harrison 2008; Flannagan y col. 2010). Los ligandos son aquellas  
459 moléculas que interaccionan de forma específica con su receptor objetivo. Una gran número de  
460 bacterias cuenta con ligandos específicos denominados adhesinas e invasinas que le permiten  
461 interaccionar con receptores y así estimular su adhesión e internalización a la célula hospedadora  
462 (Palumbo y Wang 2006; Klemm y Schembri 2000).

463       Una vez reconocida la partícula comienza la segunda etapa en la que se genera una  
464 modificación de la corteza de actina por debajo de la membrana plasmática en el sitio de contacto  
465 con dicha partícula. Esto se produce por el accionar de factores de unión a actina que  
466 despolimerizan a los filamentos por cortes en las ramificaciones producidos por Arp2/3. Como  
467 consecuencia los receptores adquieren mayor movilidad lateral en la membrana lo que les  
468 permite formar complejos estables. De esta manera mejora la adherencia de la partícula a la célula  
469 y su ingestión como consecuencia de la activación de diversas vías de señalización. A partir de este  
470 momento comienza la tercera etapa que consiste en la formación de estructuras en la membrana,  
471 impulsadas por la polimerización de actina, que van rodeando a la partícula. Esta etapa es regulada  
472 por diferentes GTPasas de la familia Rho (Mao y Finnemann 2015; Freeman y Grinstein 2014). En  
473 el caso de la fagocitosis mediada por receptores Fc se producen extensiones de membrana  
474 denominadasseudópodos por la polimerización de actina controlada por las GTPasas Rac1/2 y  
475 Cdc42 (Mao y Finnemann 2015; Rougerie y col. 2013; Ikeda y col. 2017). Dichosseudópodos se  
476 extenderán hasta rodear completamente a la partícula (Diakonova 2002). Cuando los receptores  
477 implicados son los CR3, las modificaciones a nivel de la membrana son más sutiles. Se generan  
478seudópodos pequeños en la zona de contacto quedando la partícula inmersa en una especie de  
479 invaginación de la membrana (Rougerie y col. 2013; Mao y Finnemann 2015). La GTPasa principal  
480 del proceso es RhoA ya que se ha observado que al inhibir sus efectores ROCK (Olazabal y col.  
481 2002) o la formina mDia1 (Colucci-Guyon y col. 2005), disminuye la fagocitosis por CR3. El proceso  
482 concluye con el cierre del pseudópodo (o estructura membranosa involucrada) que se produce  
483 por la fuerza contráctil generada por miosinas. Concluido el cierre, la partícula fagocitada queda

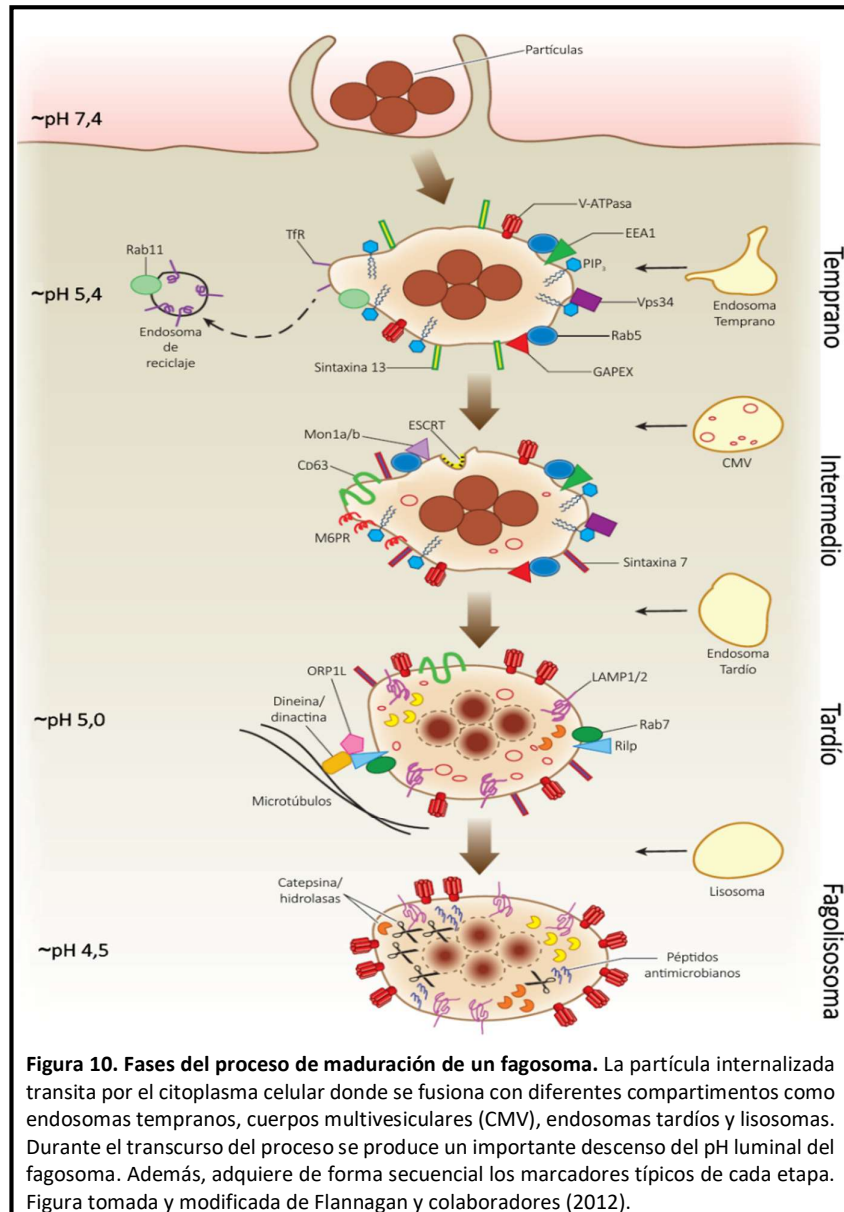
484 secuestrada en un compartimiento intracelular denominado fagosoma (Olazabal y col. 2002;  
485 Swanson y col. 1999).



## 486 I.2.2 Trafico intracelular de un fagosomas

487 El fagosoma formado inicialmente es un compartimiento inocuo incapaz de degradar la  
488 partícula que contiene en su interior. Sin embargo, a medida que progresa su tránsito intracelular  
489 va pasando por diferentes etapas durante las cuales cambia gradualmente su composición y  
490 características, proceso denominado maduración. Finalmente, la partícula arriba a un  
491 compartimiento con un pH luminal próximo a 4.5, altamente oxidativo y enriquecido en enzimas  
492 hidrolíticas por lo que se degrada. Durante la maduración el tamaño del fagosoma se mantiene  
493 relativamente constante. Esto se puede deber a que se producen fusiones completas con  
494 compartimentos endocíticos equilibradas con fisiones de membrana, o bien a que solo se  
495 producen contactos transitorios con compartimentos endocíticos (modelo “kiss and run”). Todo  
496 el proceso se coordina estrictamente por una familia de proteínas denominadas GTPasas Rab. En  
497 base a la ganancia y pérdida temporal de distintos marcadores moleculares y cambio de pH,  
498 principalmente, se distinguen tres tipos de fagosomas: tempranos, tardíos y fagolisosomas (figura  
499 10) (Flannagan y col. 2012).





500 **Fagosoma temprano:** El fagosoma recién formado presenta un pH próximo a 6.5 y recluta  
 501 la GTPasa Rab5 por un mecanismo conocido parcialmente. Esta GTPasa es un marcador típico de  
 502 la etapa temprana y sumamente importante para el desarrollo de la maduración (Bucci y col.  
 503 1992; Gorvel y col. 1991). Su actividad la lleva a cabo a través de sus efectores EEA1 ("early  
 504 endosomal antigen 1") (Callaghan y col. 1999) y el complejo p150-Vps34 ("Vacuolar protein  
 505 sorting 34"). p150-Vps34 interacciona de forma directa con Rab5 y aumenta los niveles de PIP<sub>3</sub>  
 506 ("phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate") en la membrana (Murray y col. 2002; Christoforidis y  
 507 col. 1999). La acumulación de PIP<sub>3</sub> recluta al fagosoma EEA1 el cual al interaccionar con sintaxina  
 508 13 favorece la fusión de membranas (McBride y col. 1999; Simonsen y col. 1998). Sintaxina 13

509 forma parte de una familia de proteínas denominada SNARE ("N-ethylmaleimide-sensitive factor  
510 attachment protein receptor") que median fusión de membrana (Bock y Scheller 1999). Como se  
511 mencionó anteriormente, el tamaño del fagosoma no varía demasiado por lo que estos eventos  
512 de fusión se compensan con procesos de fisión. En estos últimos actúan diversas proteínas como  
513 Rab4, Rab11, EHDs ("Eps15 homology domain proteins") y complejos como el retrómero y COPI  
514 ("coat complex protein I") que permiten el transporte de vesículas que reciclan desde el fagosoma  
515 a la membrana plasmática o que viajan hacia el aparato de Golgi (Grant y Donaldson 2009).  
516 Aquellas moléculas transportadas ("cargos") que deban ser degradadas serán enviadas al lumen  
517 del fagosoma en pequeñas vesículas intraluminales (VILs) generadas por invaginación de la  
518 membrana del fagosoma. Este proceso es regulado por la actividad de complejos ESCRT  
519 ("endosomal sorting complex for transport") (Schmidt y Teis 2012). A este estadio de maduración  
520 se lo suele denominar intermedio ya que es predecesor del fagosoma tardío.

521       **Fagosoma tardío:** El paso a este compartimiento está marcado por un descenso del pH  
522 luminal del fagosoma (pH 5.5-6.0), por el aumento de bombas de protones ATPasas vacuolares  
523 (v-ATPase) (Sun-Wada y col. 2009) y el reclutamiento de la GTPasa Rab7 (uno de sus marcadores  
524 característicos) (Vieira y col. 2003). La primera instancia en la formación del fagosoma tardío  
525 ocurre con el reclutamiento del complejo Mon1/Ccz1 (Nordmann y col. 2010). Para ello Mon1a  
526 es reclutado e interacciona con Rab5-GTP a través de su segmento C-terminal. Luego Mon1a, esta  
527 vez a través de su extremo N-terminal, se une a Ccz1 para formar el complejo (Kinchen y  
528 Ravichandran 2010). Mon1/Ccz1 cumple varias funciones en la maduración del fagosoma. En  
529 primer lugar, desplaza a Rabex-5 (GEF de Rab5) de la membrana del fagosoma lo que produce  
530 como consecuencia el intercambio de GTP por GDP en Rab5 y su inactivación (Poteryaev y col.  
531 2010). Además, es capaz de actuar como GEF de Rab7 y promover su activación (Nordmann y col.  
532 2010). Mon1/Ccz1 también puede interacciona con el núcleo del complejo HOPS ("homotypic  
533 fusion and protein sorting"), el cual contiene proteínas accesorias que actúan como GEF de Rab7  
534 (Poteryaev y col. 2010). Una vez activo, Rab7 tiene dos efectores importantes: RILP ("Rab7-  
535 interacting lysosomal protein") y ORP1L ("oxysterol-binding protein-related protein 1"). Estos  
536 regulan la asociación de complejo motor dineína/dinactina con el fagosoma (Johansson y col.  
537 2007). Este evento permite que los fagosomas transiten hacia la región perinuclear para  
538 fusionarse con lisosomas (Johansson y col. 2007). La membrana del fagosoma tardío se enriquece  
539 de proteínas glicosiladas denominadas LAMP 1/2 ("Lysosome-associated membrane proteins")

540 (Huynh y col. 2007). Durante esta etapa continúan formándose VILs ricas en ácido lisobifosfatídico  
541 (Fairn y Grinstein 2012) y CD63 (Pols y Klumperman 2009).

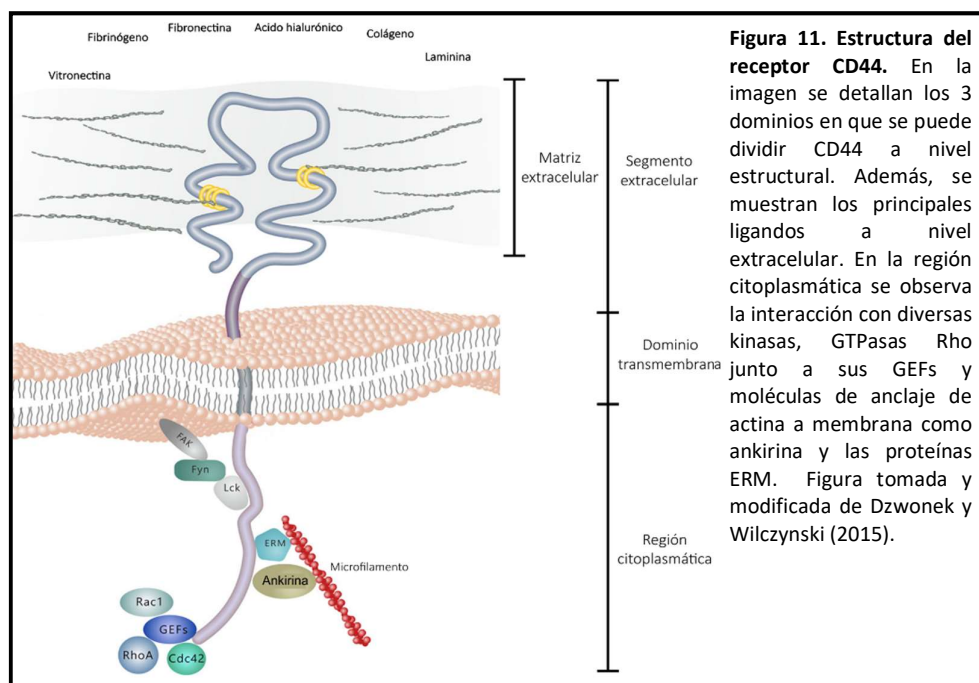
542 **Fagolisosoma:** La formación de VILs regula la homeostasis de colesterol en la membrana  
543 del fagosoma que será importante para permitir la fusión con lisosomas y formar así el  
544 fagolisosoma (Kobayashi y col. 1999). Éste es el último compartimento de la vía fagocítica y de  
545 maduración del fagosoma, el cual adquiere un pH ácido (pH 4.5-5.5) y enzimas hidrolíticas ácidas  
546 como las catepsinas (Fairn y Grinstein 2012).

### 547 1.2.3 CD44 y su relación con el proceso fagocítico

548 CD44 es una glicoproteína de membrana codificada por un único gen. Puede expresarse  
549 en su forma estándar (CD44s) o como 10 isoformas diferentes de mayor tamaño producidas por  
550 “splicing alternativo” de su segmento extracelular (CD44v). CD44s tiene una distribución ubicua  
551 en los diferentes tejidos mientras que las isoformas se encuentran restringidas a ciertas células  
552 epiteliales. CD44 es el receptor principal del ácido hialurónico (AH), pero también es capaz de  
553 interaccionar con otros componentes de la matriz extracelular como colágeno, laminina,  
554 fibronectina, fibrinógeno, vitronectina. A nivel estructural presenta un segmento extracelular de  
555 longitud variable dependiendo de la isoforma y sitios de unión para los diferentes ligandos. Posee  
556 un dominio transmembrana que regula su distribución en la membrana plasmática y el  
557 reclutamiento a dominios “lipid rafts”. En su región citoplasmática tiene sitios de unión a proteínas  
558 ERM y ankirina por las que se relaciona con el citoesqueleto de actina (Thorne y col. 2003). El sitio  
559 de unión a proteínas ERM es una pequeña secuencia de residuos básicos muy cercana a la  
560 membrana plasmática (Yonemura y col. 1998; Legg y Isacke 1998). La estructura de CD44 junto a  
561 sus principales ligandos y moléculas de la vía de señalización se ilustran en la Figura 11.

562 CD44 es capaz de modular el citoesqueleto de actina a través de diferentes vías. En primer  
563 lugar, puede establecer una relación directa con filamentos de actina mediante su interacción con  
564 proteínas ERM y ankirina (Thorne y col. 2003). Por otro lado, Hirao y colaboradores (1996)  
565 demostraron que moesina al interaccionar con CD44 puede secuestrar RhoGDIs, mantenerlos en  
566 la membrana y producir la activación de la vía de señalización de RhoA/ROCK. Diversos estudios  
567 han confirmado que la estimulación de CD44 por AH es capaz de regular las vías de RhoA, Rac1 y

568 Cdc42 (Bourguignon 2008). También se ha observado que la disrupción de los microfilamentos  
 569 puede inhibir la señalización producida por la interacción del receptor con AH (Wang y col. 2014).



570 CD44 es conocido por su rol en la endocitosis y el metabolismo de su ligando principal, el  
 571 ácido hialurónico. Además, por su capacidad de interaccionar con componentes de la matriz  
 572 extracelular, se lo asocia de forma directa a la adhesión y migración celular. Sin embargo, durante  
 573 la última década aparecieron diversos trabajos que evidencian su participación en el proceso  
 574 fagocítico. Estudios realizados por Vachon y colaboradores (2006) demostraron que CD44 puede  
 575 actuar como un receptor fagocítico completamente funcional capaz de internalizar grandes  
 576 partículas de forma independiente a los receptores fagocíticos clásicos (CR3 y FcR). La fagocitosis  
 577 mediada por este receptor es regulada por las GTPasas Rho formándose un fagosoma  
 578 completamente maduro. Además, CD44 puede tener un rol como coreceptor en el proceso ya  
 579 que se ha observado que su estimulación induce la activación “inside-out” de CR3 (Vachon y col.  
 580 2007). En algunos casos su rol en la fagocitosis es más complejo y aún no se llega a un acuerdo,  
 581 como sucede con estudios que emplean anticuerpos contra CD44. Por un lado, se ha determinado  
 582 que el tratamiento con anticuerpos específicos para CD44 puede inhibir la fagocitosis de glóbulos  
 583 rojos opsonizados por medio de FcγR y CR3 en macrófagos (Amash y col. 2016). Mientras que, se  
 584 ha determinado que el entrecruzamiento de CD44 producido por anticuerpos aumenta la  
 585 fagocitosis de células apoptóticas por neutrófilos (Hart y col. 2012).

Diversos estudios implican de forma directa a CD44 en la interacción de diferentes bacterias con la célula hospedadora. La internalización de *Shigella* en células epiteliales depende de la interacción de su efector IpaB con CD44 (Skoudy y col. 2000). Además, dicho proceso genera reordenamientos en el citoesqueleto de actina para los cuales ezrina es fundamental (Skoudy y col. 1999). *Listeria monocytogenes* aprovecha la función de CD44 como coreceptor, a través de su efector LnlB, para invadir la célula hospedadora (Jung y col. 2009). *Mycobacterium tuberculosis* es capaz de interaccionar de forma directa con CD44 y lograr de esta manera su ingreso en macrófagos (Leemans y col. 2003).

### 1.3 Manejo de la vía endocítica por patógenos intracelulares

Diversos microorganismos, conocidos como patógenos intracelulares, han evolucionado para sobrevivir dentro de la célula hospedadora. Aquellas bacterias que solo pueden desarrollarse dentro de la célula se las denomina patógenos intracelulares obligados. En este tipo de ambiente obtienen ciertas ventajas como la evasión de la respuesta inmune humoral y celular además de una fuente de nutrientes constante provistos por el hospedador. Evidentemente, las estrategias que estos microorganismos empleen para lograr entrar a la célula hospedadora y para su desarrollo intracelular serán de vital importancia para su supervivencia.

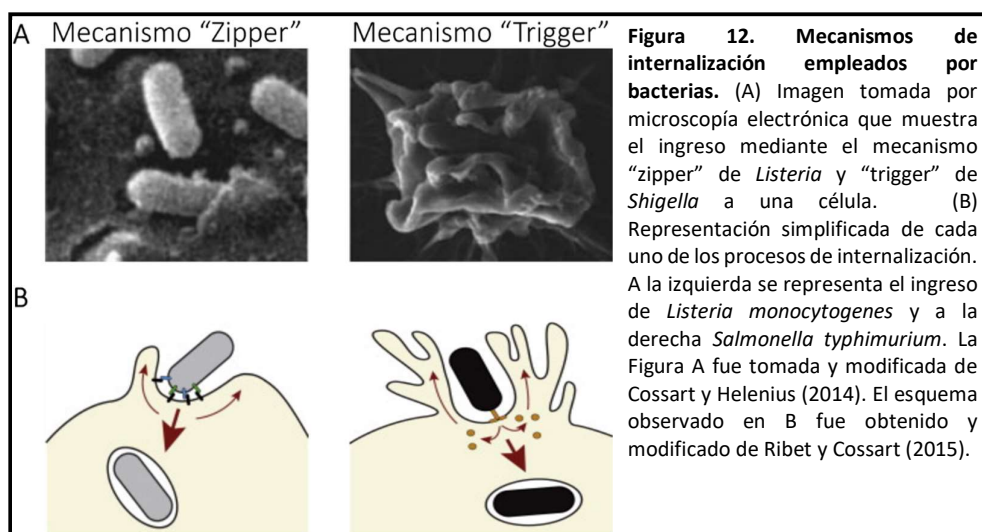
#### 1.3.1 Vías de ingreso a la célula

Algunas bacterias pueden ingresar en las células hospedadoras empleando dos mecanismos principales conocidos como “zipper” (cremallera) y “trigger” (gatillo) (figura 12). Ambos procesos dependen de reorganizaciones en el citoesqueleto de actina producidas por el contacto de la bacteria con la membranas de la célula (Ribet y Cossart 2015; Pizarro-Cerdá y col. 2016).

El mecanismo “zipper” se genera por interacción directa entre proteínas presentes en la superficie de la bacteria (adhesinas) y receptores del hospedador (integrinas, caderinas, entre otros). De esta forma se producen complejos que activan vías de señalización intracelular que culminan con la entrada del microorganismo (Pizarro-Cerdá y col. 2006). La bacteria modelo de este mecanismo es *Listeria monocytogenes* que ingresa a células epiteliales empleando las proteínas de superficie Internalina A y B. Estas moléculas interaccionan con los receptores de membrana E-cadherina y c-Met, respectivamente (Shen y col. 2000; Mengaud y col. 1996). Como consecuencia se desencadenan vías de señalización que producen la reorganización de los

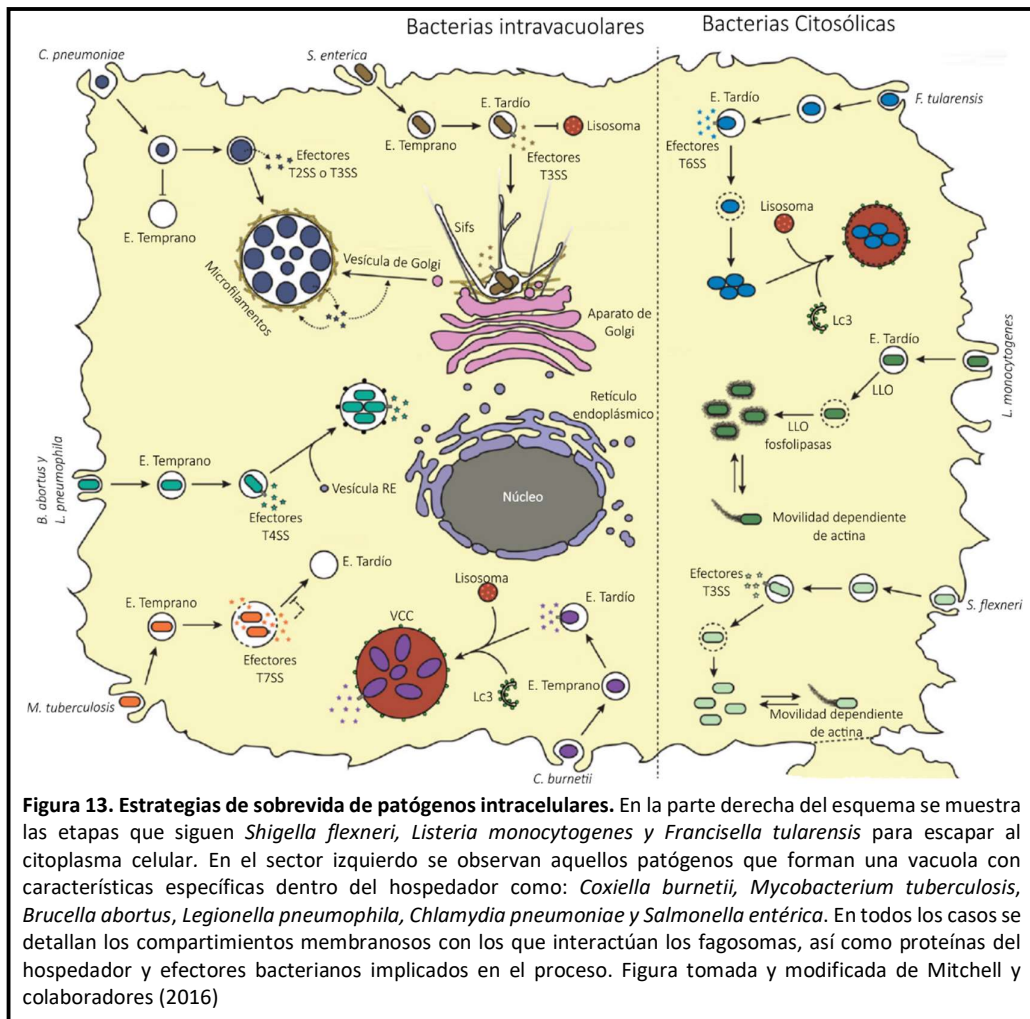
616 microfilamentos y la internalización de la bacteria adherida. Otra bacteria que emplea el  
 617 mecanismo “zipper” es *Yersinia spp.* que interacciona con integrinas  $\beta_1$  gracias a la presencia de  
 618 una alta densidad de invasinas en su membrana (OMPs: “Outer membrane proteins”) (Pepe y  
 619 Miller 1993). Esta unión recluta FAK y Src al sitio de entrada de la bacteria, lo que induce  
 620 reorganizaciones en el citoesqueleto de actina que concluyen con la internalización del patógeno  
 621 (Bruce-Staskal y col. 2002; Alrutz y Isberg 1998). Se ha observado que en este proceso actúan  
 622 también la GTPasa Rac1 y el complejo Arp2/3 (Alrutz y col. 2001). Este mecanismo es empleado  
 623 también por *Helicobacter pylori* durante su internalización en cultivos de células epiteliales (Kwok  
 624 y col. 2002).

625 El mecanismo “trigger” implica la liberación de efectores del patógeno dentro del  
 626 citoplasma celular. Para ello las bacterias cuentan con diferentes maquinarias proteicas especiales  
 627 denominadas sistemas de secreción (Green y Mecsas 2016). El objetivo de los efectores es  
 628 producir importantes remodelaciones del citoesqueleto de actina que se traducen en drásticas  
 629 ondulaciones de la membrana plasmática que permiten el ingreso del patógeno. Algunos de los  
 630 microorganismos que utilizan el mecanismo “trigger” son *Shigella flexneri* (Garza-Mayers y col.  
 631 2015; Skoudy y col. 1999; High y col. 1992; Clerc y Sansonetti 1987) y *Salmonella typhimurium*.  
 632 Esta última tiene la particularidad de poder ingresar a la célula por ambos mecanismos (Velge y  
 633 col. 2012).



### 634 1.3.2 Estrategias de supervivencia de patógenos dentro de la célula 635 hospedadora

636 Una vez dentro de la célula los microorganismos manipulan la vía endocítica del  
637 hospedador para transformar un ambiente hostil en uno óptimo para su desarrollo. Las bacterias  
638 intracelulares pueden sobrevivir dentro de una vacuola con características adaptadas por cada  
639 patógeno de acuerdo a sus requerimientos de crecimiento o bien pueden escapar hacia el  
640 citoplasma celular (figura 13).



641 **Formación de una vacuola "única":** Ciertas bacterias son capaces de regular la vía  
642 fagocítica para formar una vacuola con características diferentes a los compartimentos  
643 intracelulares clásicos. *Salmonella* spp. mediante la liberación de efectores por su sistema de  
644 secreción tipo III (T3SS) forma una vacuola particular con túbulaciones denominadas Sifs  
645 ("*Salmonella*-induced filaments"). El compartimento presenta características mixtas con

646 marcadores tempranos (Rab5, EEA1 y el receptor de transferrina), tardíos (Rab7) y lisosomales  
647 (LAMP1 y V-ATPasa) (Steele-Mortimer 2008). A pesar de presentar marcadores lisosomales, se ha  
648 observado que *Salmonella* evita la fusión de su vacuola con lisosomas gracias al efector SopD2 que  
649 interactúa con Rab7 e inhibe su actividad (D'Costa y col. 2015). Además, la bacteria interfiere el  
650 tráfico de vesículas cargadas con el receptor a manosa-6-fosfato (receptor que transporta las  
651 enzimas hidrolíticas hacia los endosomas tardíos) enviando su contenido de al exterior celular. Por  
652 esta razón, la vacuola de *Salmonella* presenta bajos niveles de enzimas hidrolíticas como cathepsina  
653 D (Steele-Mortimer 2008). *Brucella abortus* y *Legionella pneumophila* evitan la interacción del  
654 fagosoma que las contiene con lisosomas. Las vacuolas que forman interaccionan con y adquieren  
655 marcadores del retículo endoplásmico y vía autofágica. Este comportamiento se debe que estos  
656 patógenos manipulan al hospedador a través de sus respectivos sistemas de secreción tipo IV  
657 (T4SS) (Roy y Kagan 2013; Asrat y col. 2014). *Chlamydia sps.* desarrolla una vacuola patogénica  
658 denominada "inclusión" que se separa de la vía endocítica clásica evitando fusión con endosomas  
659 y lisosomas. A pesar de esto, es altamente fusogénica con distintas vesículas celulares lo que le  
660 permite adquirir lípidos y nutrientes. Otra característica particular de la "inclusión" es la presencia  
661 de una gran variedad de proteínas Rab en su membrana (Fields y Hackstadt 2002).  
662 *Mycobacterium tuberculosis* detiene la maduración del fagosoma en forma temprana ya que  
663 presenta Rab5, sin embargo no contiene PI<sub>3</sub>P ("phosphatidylinositol 3-phosphate") ni recluta EEA1  
664 (Fratti y col. 2001). Esto lo produce mediante un lípido en su membrana (lipoarabinomano) que  
665 inhibe la vía de señalización de PI3K (Fratti y col. 2003). También libera efectores, como SapM,  
666 capaces de hidrolizar PI<sub>3</sub>P presente en la membrana de la vacuola (Vergne y col. 2005). A pesar de  
667 que la maduración se encuentra detenida, el fagosoma puede interaccionar con endosomas de  
668 reciclaje de los cuales obtiene nutrientes para su crecimiento.

669       Dentro de este grupo también se encuentra *Coxiella burnetii* cuyas características se  
670 analizan en detalle en la siguiente sección.

671       **Escape hacia el citosol:** Comprende aquellas bacterias que se liberan del fagosoma y se  
672 desarrollan en el citoplasma de la célula. Entre ellas encontramos a *Listeria monocytogenes*, que  
673 en primera instancia detiene la maduración del fagosoma regulando Rab5 a través de una  
674 proteína denominada Lmo 2459 (Alvarez-Dominguez y col. 2008). Además, produce poros en la  
675 membrana de la vacuola que la contiene mediante la acción de Listeriolisina O (LLO) (Cossart y col.  
676 1989). A través de los poros, libera al citoplasma dos enzimas denominadas fosfatidil-inositol



fosfolipasa C y fosfatidil-colina fosfolipasa C que interaccionan con lípidos en la hemimembrana externa del fagosoma y los solubilizan (Smith y col. 1995) provocando la lisis de la vacuola y la liberación de la bacteria en el citoplasma.

Un caso distinto es el de *Shigella flexneri* que utiliza su sistema de secreción tipo III para inyectar en el citoplasma celular efectores conocidos como IpaB, IpaC e IpaD. Estas moléculas son capaces de interaccionar con dominios ricos en colesterol presentes en la membrana y formar poros en el fagosoma (High y col. 1992; Page y col. 1999; Picking y col. 2005). Se cree que, para concretar la lisis de la vacuola, la bacteria secretaría también fosfolipasas pero en la actualidad no está fehacientemente comprobado.

Otras bacterias que emplean esta estrategia, pero sobre las cuales aún no se conocen con exactitud el mecanismo por el cual lo realizan son: *Rickettsia prowazekii*, *Burkholderia* y *Francisella tularensis*. Esta última tiene la particularidad de escapar al citosol donde se replica y luego vuelve a ingresar a un compartimento membranoso denominado “vacuola que contiene a *Francisella*” (Asrat y col. 2014).

## 1.4 *Coxiella burnetii*

### 1.4.1 *Coxiella burnetii* y la fiebre Q

*C. burnetii* es una bacteria Gram negativa de tamaño pequeño con una longitud que oscila entre 0.4 a 1.0  $\mu\text{m}$  y un ancho de 0.2 a 0.4  $\mu\text{m}$  (Maurin y Raoult 1999). Está clasificada, por análisis filogenético del ARN ribosomal 16S, dentro de la subdivisión Gamma de las Proteobacterias (Weisburg y col. 1989; Stein y col. 1993). Morfológicamente es un cocobacilo altamente pleomórfico que puede encontrarse en dos variantes de diferentes tamaños: una pequeña (“small cell variant” o SCV) y una grande (“large cell variant” o LCV). La SCV se produce durante la fase estacionaria de crecimiento intracelular entre los 6 a 8 días posteriores a la infección (Maurin y Raoult 1999; Coleman y col. 2004). Es considerada una forma infecciosa extracelular capaz de resistir condiciones severas de estrés ambiental. Una vez producido el ingreso a la célula hospedadora se ha observado que el cambio hacia LCV comienza en etapas tempranas (a las 2 horas posteriores a la infección) siendo la forma prevaleciente luego del primer día de infección (Howe y Mallavia 2000; Coleman y col. 2004). La LCV es metabólicamente activa y cuenta con un sistema de secreción tipo IV B indispensable para la formación de nicho intracelular de la bacteria (McDonough y col. 2012; Zamboni y col. 2003). Luego de varios pasajes en líneas celulares, la

707 bacteria pierde parte de su LPS y se vuelve avirulenta para animales inmunocompetentes (Moos  
708 y Hackstadt 1987). En base a esto pueden diferenciarse la cepa Nine Mile I (NMI) con su LPS  
709 completo y la Nine Mile II (NMII) que lo expresa de forma truncada debido a la pérdida de genes  
710 importantes para su síntesis (Hoover y col. 2002). Sin embargo, la cinética de infección de *C.*  
711 *burnetii* NMI y NMII se desarrolla de la misma manera en macrófagos humanos (Howe y col.  
712 2010). El proceso de internalización se esquematiza en la Figura I.14.

713 *C. burnetii* es el agente causal de la fiebre Q en humanos, enfermedad que suele  
714 desarrollar un curso asintomático o mostrar una sintomatología similar a la gripe. Sin embargo, en  
715 algunos casos de infecciones agudas, los pacientes pueden desarrollar complicaciones  
716 respiratorias e incluso neumonía. Un porcentaje menor puede sufrir complicaciones que deriven  
717 en hepatitis, problemas cardíacos (miocarditis y pericarditis) o neurológicos como meningitis. En  
718 pacientes con cierta predisposición la enfermedad puede extenderse durante años  
719 convirtiéndose en crónica. En este caso las complicaciones observadas mayormente son  
720 endocarditis o riesgo de aborto en mujeres embarazadas (Angelakis y Raoult 2010).

## 721 I.4.2 Epidemiología

722 La fiebre Q es clasificada según el CDC ("Centers for Disease Control and Prevention",  
723 Atlanta, USA) como una enfermedad con distribución mundial. Es por ello que Argentina no se  
724 encuentra exenta e incluso estudios recientes detectaron la presencia de *C. burnetii* en garrapatas  
725 (Pacheco y col. 2013). Sin embargo, no hay reportes de la presencia de manifestaciones de la  
726 enfermedad en la población. El reservorio principal se encuentra en diferentes animales de campo  
727 (ovejas, cabras y ganado) como también domésticos (perros, conejos, gatos y aves) que pueden  
728 ser infectados sin presentar ningún síntoma (Angelakis y Raoult 2010). Las vías de transmisión de  
729 la bacteria son (Gürtler y col. 2014):

- 730 • Aerogénica: es la principal ruta de contagio en humanos por aerosoles contaminados.
- 731 • Contacto: exposición a tejidos o excremento de diversos animales infectados.
- 732 • Oral: consumo de alimentos contaminados.
- 733 • Transcutánea o percutánea: por picaduras de insectos (principalmente garrapatas).
- 734 • Sexual: en etapas tempranas de la infección.

735 La característica de *C. burnetii* que más se destaca y genera mayor preocupación es su  
736 persistencia. Este microorganismo puede sobrevivir fuera de su hospedador en condiciones

737 ambientales muy severas permaneciendo en un estado latente hasta 40 meses (Gürtler y col.  
738 2014; Tissot-Dupont y col. 2004; Fournier y col. 1998). También se ha observado esta característica  
739 en estudios realizados sobre animales y seres humanos que padecieron fiebre Q. Harris y  
740 colaboradores (2000) detectaron ADN genómico de *C. burnetii* en muestras de médula ósea  
741 tomadas a pacientes varios meses después de cursada la infección. En concordancia con ello  
742 resultados similares fueron obtenidos por Marmion y colaboradores (2005) en muestras de  
743 pacientes de Inglaterra y Australia, incluso 12 años después de la infección primaria. Por otro lado,  
744 estudios realizados en ratones detectaron la presencia de la bacteria en tejido adiposo 4 meses  
745 después de la infección (Bechah y col. 2014). Recientemente se han llevado a cabo trabajos, a gran  
746 escala, en poblaciones afectadas por una epidemia de fiebre Q en los Países Bajos y determinaron  
747 la presencia de antígenos de *C. burnetii* y altos niveles de IgG específicos para la bacteria (Jajou y  
748 col. 2014; Morroy y col. 2015). Hasta el momento se desconoce cuál es el mecanismo utilizado  
749 por *C. burnetii* para persistir durante largos periodos de tiempo en organismos infectados. Una  
750 hipótesis postula que solo se mantendrían “complejos inmunomodulatorios” no infectivos ni  
751 degradables, formados por antígenos, LPS y trazas de ADN genómico de la bacteria (Marmion y  
752 col. 2009).

### 753 1.4.3 Internalización de *Coxiella burnetii*

754 El ingreso de *C. burnetii* en macrófagos se desarrolla como una fagocitosis dependiente  
755 de actina y, en células no fagocíticas, mediante el mecanismo internalización tipo “zipper” (van  
756 Schaik y col. 2013). El rol de la bacteria en el proceso de internalización aparentemente es pasivo  
757 ya que se ha observado que la bacteria viva o muerta se internaliza con igual eficiencia en  
758 fibroblastos y macrófagos (Baca y col. 1993). En concordancia con esto, se ha demostrado que  
759 bacterias deficientes en su sistema de secreción son capaces de invadir diferentes tipos de células  
760 (Beare y col. 2011). Sin embargo, el proceso depende de moléculas presentes en la superficie de  
761 *C. burnetii* encargadas de interactuar con el hospedador y disparar la entrada del  
762 microorganismo. Martinez y colaboradores (2014) determinaron la presencia de una invasina en  
763 la membrana externa de *C. burnetii* denominada OmpA (“Outer membrane protein A”) que  
764 aumenta los niveles de internalización de *C. burnetii* en células no fagocíticas. Con la secuenciación  
765 del genoma completo de *C. burnetii* NMI se han propuesto posibles candidatos implicados en el  
766 proceso de adherencia e invasión de la bacteria. Entre ellos proteínas con dominios RGD (de unión  
767 a integrinas), con motivos ankirina repetidos (implicados en la interacción con componentes de la

768 matriz extracelular) y moléculas similares a EnhA/B/C que potencian la entrada de *Legionella*  
769 *pneumophila* (Seshadri y col. 2003). Recientemente se ha publicado el genoma de la cepa NMII  
770 mostrando diferencias con el de la NMI solo en secuencias relacionadas al LPS bacteriano (Millar  
771 y col. 2017).

772       Diferentes componentes de la célula hospedadora cumplen un rol importante en la  
773 internalización de *C. burnetii*. Se ha propuesto que la adhesión de la bacteria necesita de moléculas  
774 presentes en la membrana del hospedador ya que la adhesión disminuye por el tratamiento de la  
775 célula con distintas proteasas (Baca y col. 1993). Los receptores implicados en la internalización de  
776 la cepa NMII en monocitos/macrófagos son las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_M\beta_2$  (Capo y col. 1999). Un  
777 estudio reciente demuestra la participación del colesterol en el ingreso por receptores  $\alpha_v\beta_3$  y  
778 postula, en consecuencia, la posible importancia de “Lipid Rafts” (Howe y Heinzen 2006; Gilk y col.  
779 2013). La internalización de la cepa avirulenta se desarrolla de forma más eficiente que la cepa  
780 virulenta a pesar de que la primera modifica discretamente a la membrana de la célula  
781 hospedadora y los microfilamentos. En cambio, se ha observado que la forma NMI excluye el  
782 receptor  $\alpha_M\beta_2$  en el sitio de contacto y, si bien induce grandes protrusiones de membrana, ingresa  
783 menos (Capo y col. 1999). Luego se observó que las grandes protrusiones de membrana se  
784 inducen por el contacto del LPS de *C. burnetii* fase I con TLR4 (Meconi y col. 2001).

785       Las modificaciones de membrana de la célula hospedadora dependen de  
786 reordenamientos del citoesqueleto de actina (Zamboni y col. 2004; Conti y col. 2014). Los  
787 microfilamentos cumplen un rol indispensable en la infección de *C. burnetii* NMI y NMII ya que es  
788 inhibida por el tratamiento de la célula con Citocalasina B o D (agentes despolimerizantes de  
789 actina-F) (Baca y col. 1993). La regulación de los filamentos de actina en la internalización es llevada  
790 a cabo por las GTPasas Rho. En nuestro laboratorio hemos probado que en primera instancia Rac1  
791 domina el proceso para luego dar lugar a la acción de RhoA y sus efectores mDia1 y ROCK (Salinas  
792 y col. 2015). También hemos demostrado que cortactina, otro modulador clave del citoesqueleto  
793 de actina, junto a la vía de señalización de kinasa Src participan en la internalización de la cepa  
794 NMII en células epiteliales (Rosales y col. 2012).

795

#### 796 I.4.4 Biogénesis de la Vacuola que contiene a *Coxiella burnetii*

797 *Coxiella burnetii*, una vez internalizada, transita la vía fagocítica clásica. De esta manera el  
798 fagosoma que la contiene adquiere de forma secuencial Rab5 y, posteriormente, Rab7,  
799 marcadores de fagosoma temprano y tardío, respectivamente (Berón y col. 2002; Romano y col.  
800 2007; Ghigo y col. 2002). Finalmente culmina con la fusión con lisosomas para formar la  
801 característica Vacuola que Contiene a *Coxiella* (VCC).

802 En etapas iniciales, el fagosoma naciente adquiere rápidamente Rab5 y su efector EEA1  
803 que le permite aumentar su fusión con vesículas de la vía endocítica (Romano y col. 2007). La  
804 vacuola de *C. burnetii* presenta ciertas características que diferencian su proceso de maduración  
805 del de un fagosoma clásico, como el retraso en la interacción con lisosomas. Se postula que esto  
806 permite la preparación de la bacteria para afrontar los eventos posteriores. Se ha demostrado que  
807 LAMP1 y LAMP2 son determinantes para demorar la maduración del fagosoma que contiene a *C.*  
808 *burnetii* (Schulze-Luehrmann y col. 2016). Además, dicho fenómeno podría depender de la  
809 interacción temprana del fagosoma con autofagosomas ya que se ha observado el reclutamiento  
810 de LC3 (marcador típico de esta vía) en lo fagosoma luego de 5 minutos de infección (Romano y  
811 col. 2007). Sin embargo, el momento en que se produce la interacción de la VCC con la vía  
812 autofágica aún se encuentra en debate ya que un estudio reciente postula que no se detecta  
813 presencia significativa de LC3 en la vacuola a las 4 horas post-infección (Winchell y col. 2014).

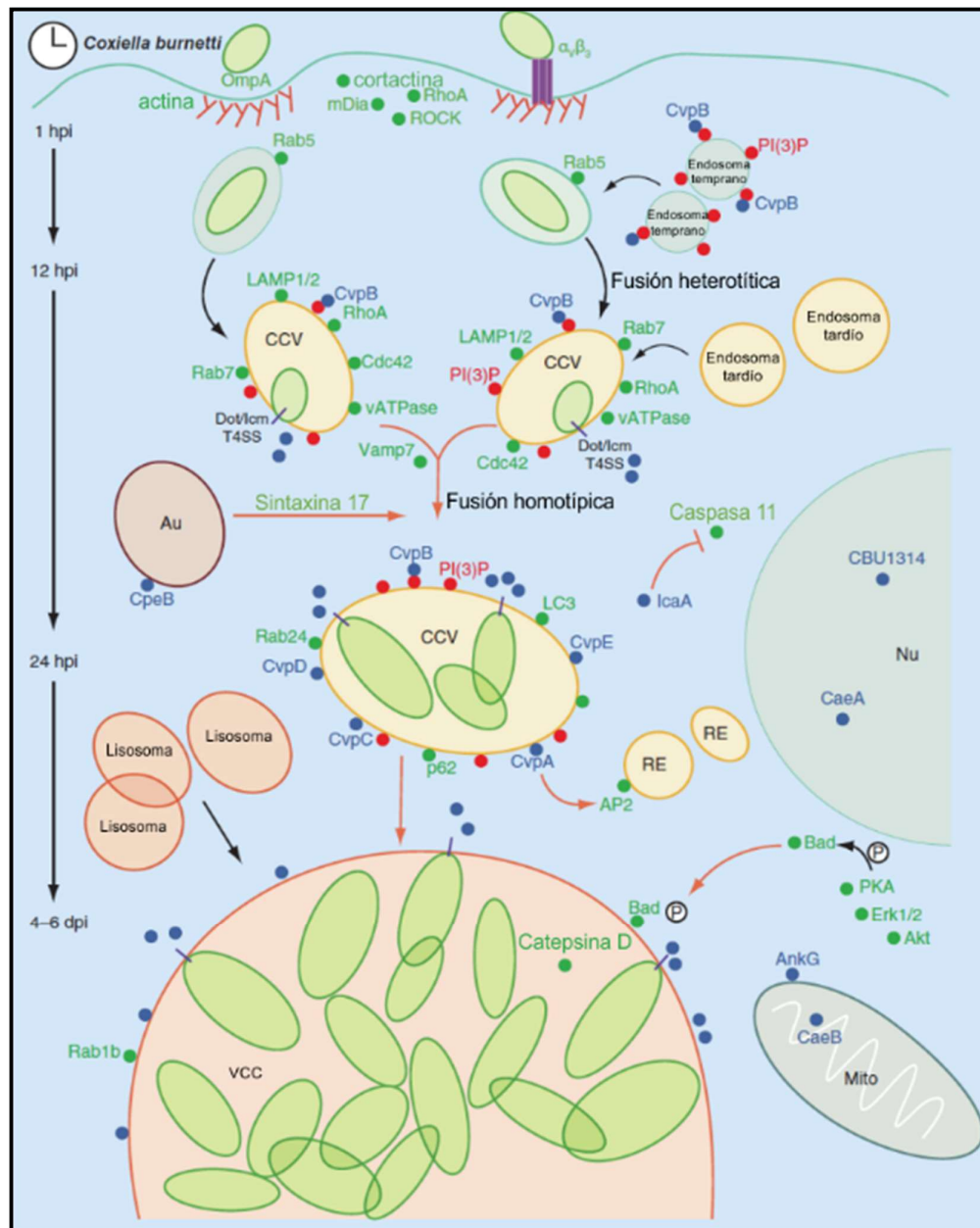
814 A diferencia del fagosoma clásico, la VCC en desarrollo aumenta su volumen a lo largo del  
815 proceso de maduración. El tamaño es una de sus características distintivas, llegando a superar los  
816 10 µm de diámetro 48 horas posteriores a la infección (MacDonald y col. 2012). Esto se debe, en  
817 parte, a la liberación de efectores por el sistema de secreción tipo IV (T4SS) de *C. burnetii* a partir  
818 de la acidificación de la VCC (luego de 8 horas post-infección en células HeLa) (Newton y col. 2013).  
819 Además, presenta una alta fusogenicidad que le permite interaccionar con una gran variedad de  
820 vesículas de distinta naturaleza. Con relación a ello, se ha observado un aumento de la fusión de  
821 la VCC en formación con diferentes compartimentos producido por la presencia de v-SNAREs  
822 (Vamp3, Vamp7 y Vamp8) en su membrana (Campoy y col. 2013). Además, se ha establecido que  
823 syntaxina 17 es importante para las fusiones homotípicas (McDonough y col. 2013). La vacuola de  
824 *C. burnetii* también interacciona con la vía de secreción del hospedador, a través de Rab1b, para  
825 mantener su desarrollo constante (Campoy y col. Colombo 2011). Como se menciona  
826 anteriormente, el fagosoma de *C. burnetii* se relaciona con la vía autofágica y esta última sería una

827 fuente de nutrientes y membranas (Steele y col. 2015; Romano y col. 2007). En concordancia con  
828 ello, se ha determinado que la inhibición de dicha vía produce una disminución notable del  
829 tamaño de la VCC (Berón y col. 2002; Gutierrez y col. 2005).

830 La biogénesis de la VCC depende, además, de efectores producidos por la bacteria. Estos  
831 se liberan al citoplasma de la célula hospedadora a través del T4SS de la bacteria y regularán  
832 diferentes componentes de la célula hospedadora. Debido a que dicho mecanismo no se activa  
833 hasta las 8 horas posteriores a la infección, se considera que las etapas tempranas de maduración  
834 son organizadas por el hospedador (Carey y col. 2011; Beare y col. 2011). Componentes de la  
835 célula como los microtúbulos y proteínas motoras, encargadas del transporte vesicular, son  
836 fundamentales para la biogénesis de la VCC (Ortiz, Distel, Aguilera y col. 2017, trabajo en revisión  
837 en *Frontiers Microbiology*). Además, se ha observado la presencia de actina en la membrana de  
838 la VCC y la participación de las GTPasas Rho en la biogénesis de la VCC (Aguilera y col. 2009). Por  
839 otro lado, el tratamiento de células infectadas con agentes despolimerizantes de actina produce  
840 una alteración en la formación de la VCC (Aguilera y col. 2009).

841 En su estadio final, la VCC representa un compartimiento único con un microambiente  
842 con pH ácido, la presencia de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y diferentes enzimas  
843 lisosomales. Su membrana presenta altos niveles de colesterol, a diferencia de un fagosoma  
844 clásico (Mulye y col. 2017; Gilk y col. 2012; Gilk y col. 2013). También, la H<sup>+</sup> ATPasa vacuolar  
845 (Heinzen y col. 1996), Rab 7 (Romano y col. 2007; Berón y col. 2002; Ghigo y col. 2002),  
846 glicoproteínas lisosomales como LAMP-1, LAMP-2 y LAMP-3 (CD63) (Heinzen y col. 1996; Howe y  
847 col. 2010), flotilina 1 y 2 (Howe y Heinzen 2006) y los marcadores autofagosomales como LC3  
848 (Romano y col. 2007; Berón y col. 2002), Rab 24 (Gutierrez y col. 2005) catepsina D (Howe y col.  
849 2010). El proceso completo de internalización y desarrollo de la VCC se resume en la figura 14.

**Figura 14. Internalización y biogénesis de la vacuola que contiene a *C. burnetii*.** El ingreso de *C. burnetii* se produce a través de integrinas  $\alpha_v\beta_3$  en células no fagocíticas. Este proceso se desarrolla de forma pasiva mediante proteínas de la superficie de la bacteria como la invasina OmpA y del hospedador como actina, RhoA y sus efectores, cortactina. Al ingresar al hospedador reside en un pequeño fagosoma que sufre en primera instancia fusiones de tipo heterotípica con endosomas tempranos y tardíos adquiriendo sus respectivos marcadores. Además, esto va acompañado de la acidificación de la VCC en formación lo que activa el T4SS de la bacteria permitiendo la liberación de diversos efectores (azul) los que modulan la respuesta del hospedador. A partir de este momento, la VCC aumenta considerablemente su tamaño al fusionarse con otras VCC (fusión homotípica), autofagosomas (Au) y lisosomas. Figura tomada y modificada de Larson y colaboradores (2016).



## 851 CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 852 II.1 Hipótesis

853 *Coxiella burnetii* es un parásito intracelular obligado que transita a lo largo de la ruta  
854 fagocítica hasta llegar a un compartimiento con características fagolisosomales llamado vacuola  
855 parasitófora (VP), donde reside y se multiplica. Es bien conocido que el citoesqueleto de actina  
856 cumple un papel fundamental en el proceso de fagocitosis. Proponemos que actina y proteínas  
857 que regulan su dinámica tales como ERM y proteínas asociadas participan como parte del  
858 mecanismo molecular involucrado en la fagocitosis de *C. burnetii* y en la biogénesis de la VP. El  
859 conocimiento de la interrelación entre la célula hospedadora y *C. burnetii* podría contribuir al  
860 diseño de estrategias adecuadas para atenuar la virulencia de dicho patógeno.

861

### 862 II.2 Objetivo General

863 Determinar el rol de las proteínas ERM y proteínas asociadas, reguladoras del  
864 citoesqueleto de actina de células hospedadora, en la fagocitosis de *Coxiella burnetii*.

#### 865 II.2.1 Objetivos Específicos

- 866 1. Estudiar la participación de las proteínas ERM y proteínas asociadas en la internalización  
867 de *Coxiella burnetii* a la célula hospedadora.
- 868 2. Estudiar la participación de las proteínas ERM y proteínas asociadas en la formación de la  
869 vacuola parasitófora donde reside *Coxiella burnetii*.



## 870 CAPÍTULO III: RESULTADOS

871 Como se menciona en el primer capítulo de este manuscrito, el citoesqueleto de actina es  
872 una estructura fundamental para la internalización de *C. burnetii* y la posterior formación de la  
873 VCC. Una gran cantidad de proteínas se encuentran implicadas en regular los diversos aspectos  
874 que determinarán la dinámica de actina. En nuestro laboratorio se han establecido algunas de las  
875 proteínas asociadas a microfilamentos que intervienen durante la infección de *C. burnetii*. En  
876 relación a ello, hemos demostrado que la actividad de las GTPasas RhoA, Rac1 y Cdc42 son  
877 indispensables para la internalización de *C. burnetii* (Salinas y col. 2015) así como también para la  
878 formación de la VCC (Aguilera y col. 2009). Además observamos que los efectores de RhoA, mDía1  
879 y ROCK, tienen un rol clave en el ingreso de la bacteria a la célula hospedadora (Salinas y col. 2015).

880 En este trabajo se analizó la vía de señalización de RhoA/ROCK durante la infección de *C.*  
881 *burnetii*. Diversos estudios demuestran la íntima relación que existe entre las proteínas analizadas  
882 en este trabajo. En primer lugar, como se menciona en la introducción, ROCK puede actuar de  
883 forma directa sobre sus efectores (ERMs, MNM II y LIMK) e inducir su activación a través de la  
884 fosforilación. Además, puede prevenir la desfosforilación de las proteínas ERM y MNM II al  
885 bloquear la función de la fosfatasa de miosina (Kimura y col. 1996). Por otro lado, las proteínas  
886 ERM son capaces de interaccionar con los RhoGDIs y promover así su disociación de RhoA  
887 generando como resultado un “bucle de activación” (Takahashi y col. 1997). Esto permitiría una  
888 mayor actividad de la vía RhoA/ROCK produciendo modificaciones en el citoesqueleto de actina.

### 889 III.1 Resultados del primer objetivo específico

890 **Estudiar la participación de las proteínas ERM y proteínas asociadas en la internalización de**  
891 ***Coxiella burnetii* a la célula hospedadora.**

#### 892 III.1.1 La sobreexpresión de RhoGDI $\alpha$ afecta la internalización de

893 *Coxiella burnetii*

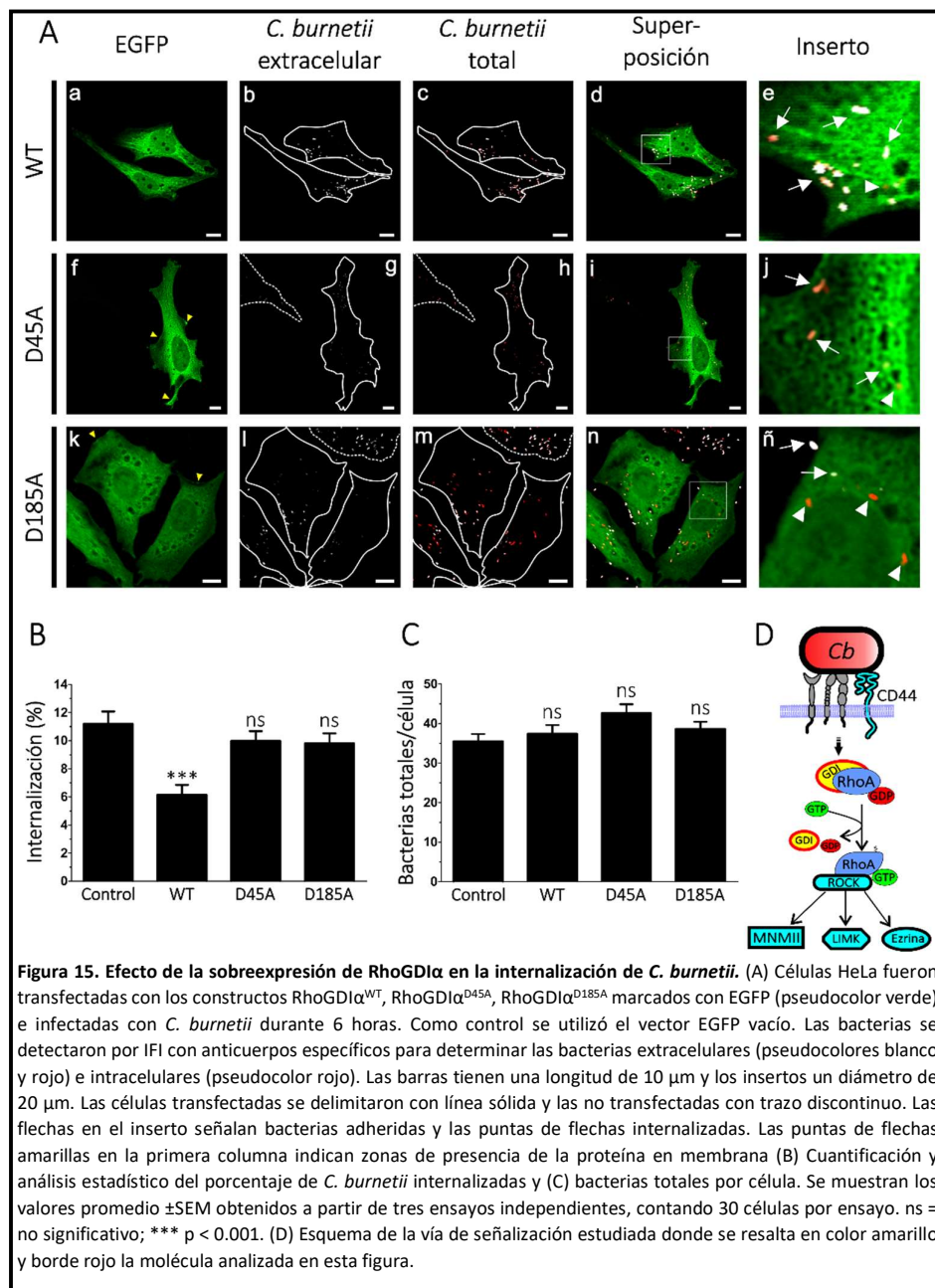
894 Los RhoGDIs regulan la actividad de las GTPasas Rho y de esta manera participan en el  
895 control de la dinámica del citoesqueleto de actina. Son capaces de interaccionar con las GTPasas  
896 unidas a GDP y mantenerlas, de esta manera, en su estado inactivo en el citoplasma celular,  
897 además de protegerlas de su degradación por proteasomas (Rolli-Derkinderen y col. 2005; Garcia-  
898 Mata y col. 2011; Boulter y col. 2010). Trabajos realizados en nuestro laboratorio indican que las

899 GTPasas de la familia Rho (RhoA, Rac1 y Cdc42) son fundamentales en la internalización de *C.*  
900 *burnetii* (Salinas y col. 2015). Para complementar estos resultados se estudió el rol de RhoGDI $\alpha$   
901 durante el ingreso de *C. burnetii* a la célula hospedadora. Seleccionamos esta isoforma para el  
902 estudio debido a que es la única que se expresa de forma ubicua, mientras que RhoGDI $\beta$  se  
903 encuentra en células hematopoyéticas y RhoGDI $\gamma$  en cerebro (Ueyama y col. 2013). Además,  
904 RhoGDI $\alpha$  es el miembro mejor estudiado de la familia y trabajos previos han demostrado que es  
905 capaz de interactuar con RhoA, Rac1 y Cdc42 (DerMardirossian y Bokoch 2005) (figura 15.D).

906 Para estudiar el efecto de RhoGDI $\alpha$  en la internalización de *C. burnetii* se trabajó con  
907 constructos asociados a EGFP que codifican: RhoGDI $\alpha^{WT}$  (forma salvaje de la proteína) y dos  
908 mutantes puntuales denominadas RhoGDI $\alpha^{D45A}$  y RhoGDI $\alpha^{D185A}$ . Estas mutaciones producen la  
909 pérdida de la actividad inhibitoria de la proteína, sin embargo, no afectan la capacidad de RhoGDI $\alpha$   
910 para interactuar con las diferentes GTPasas (Dransart y col. 2005). También se ha propuesto que  
911 las mutantes RhoGDI $\alpha^{D45A}$  y RhoGDI $\alpha^{D185A}$  producen interacciones débiles y transitorias con  
912 GTPasas como Rac1 (Ueyama y col. 2013). Por otro lado, se ha observado que la sobreexpresión  
913 de RhoGDI $\alpha^{WT}$ , pero no de sus mutantes RhoGDI $\alpha^{D45A}$  y RhoGDI $\alpha^{D185A}$ , aumenta los niveles  
914 celulares de RhoA, Rac1 y Cdc42 (Boulter y col. 2010). Esto se produciría probablemente por la  
915 interacción permanente de RhoGDI $\alpha^{WT}$  con las GTPasas lo que produciría la protección de la  
916 degradación e inhibición de estas últimas.

917 Para estudiar a RhoGDI $\alpha$  se emplearon células HeLa transfectadas con los plásmidos  
918 mencionados previamente e infectadas con una suspensión de *C. burnetii* durante 6 horas.  
919 Posteriormente, las células se procesaron para inmunofluorescencia indirecta (IFI) para  
920 determinar las bacterias intracelulares y extracelulares empleando anticuerpos contra *C. burnetii*  
921 y se analizaron por microscopía de fluorescencia confocal. En la figura 15.A se puede observar la  
922 distribución de las distintas formas de RhoGDI $\alpha$  fusionadas a EGFP (pseudocolor verde). La  
923 proteína salvaje (15.A.a) se encuentra de forma predominante en el citosol celular mientras que  
924 ambas mutantes RhoGDI $\alpha^{D45A}$  (15.A.b) y RhoGDI $\alpha^{D185A}$  (15.A.c) se distribuyen en el citoplasma y  
925 menor medida en algunas regiones discretas de la membrana plasmática (15.A puntas de flecha  
926 amarillas). En cuanto a las bacterias, se pueden diferenciar las bacterias extracelulares  
927 (pseudocolores rojo y blanco) indicadas con una flecha y las intracelulares (pseudocolor rojo,  
928 únicamente) marcadas con punta de flecha. Los valores de internalización de *C. burnetii*  
929 disminuyeron muy significativamente (45% respecto al control EGFP vector) en aquellas células

930 que sobreexpresaban RhoGDI $\alpha^{WT}$ . Sin embargo, en células transfectadas con las mutantes  
 931 RhoGDI $\alpha^{D45A}$  o RhoGDI $\alpha^{D185A}$  no se generaron cambios significativos en el número de bacterias  
 932 que ingresaron a la célula hospedadora (figura 15.B). La adhesión de *C. burnetii* a la célula no se  
 933 vio afectada por la expresión de los diferentes constructos empleados ya que los valores de  
 934 bacterias totales asociadas se mantuvieron constantes (figura 15.C). Estos resultados refuerzan lo  
 935 observado previamente en nuestro laboratorio e indican que RhoGDI $\alpha$  es capaz de inhibir el  
 936 proceso de internalización de *C. burnetii*.

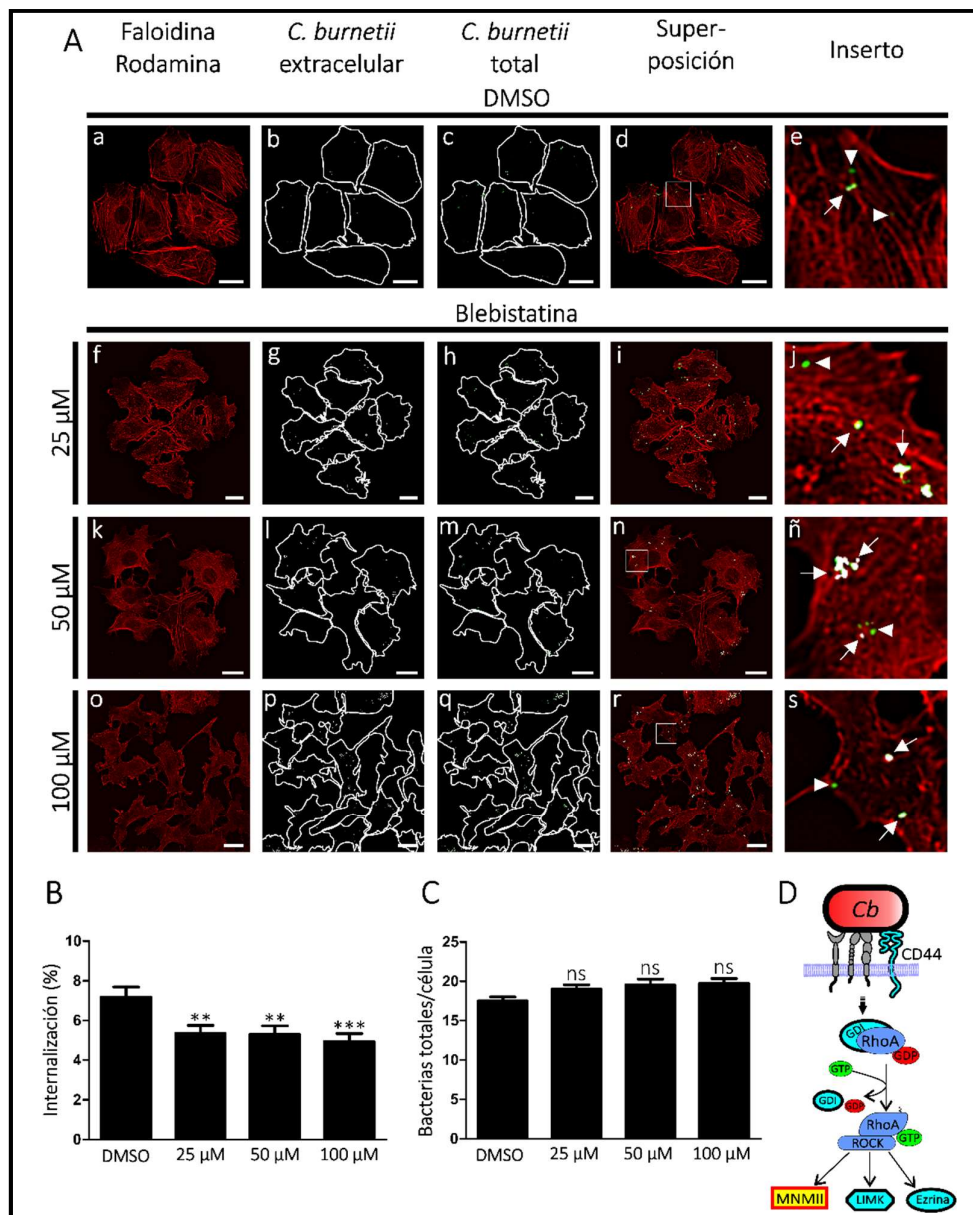


### 937 III.1.2 La internalización de *Coxiella burnetii* es disminuida por el 938 tratamiento con blebistatina

939 La principal GTPasa Rho implicada en la internalización de *C. burnetii* es RhoA, la cual actúa  
940 a través de sus dos efectores mDia1 y ROCK (Salinas y col. 2015). Los miembros más importantes  
941 de la vía de señalización de ROCK, implicados en la regulación del citoesqueleto de actina, son  
942 miosina no muscular tipo II (MNM II), las kinasas LIM (LIMK) y las proteínas ERM (figura 16.D). Las  
943 miosinas son proteínas motoras generadoras de la tracción y la tensión de las fibras de actina  
944 mediante la hidrólisis de ATP. Tienen un rol fundamental en diversos procesos celulares como  
945 adhesión, citocinesis, movilidad (Conti y col. 2008), endocitosis mediada por clatrina  
946 (Chandrasekar y col. 2014) y fagocitosis por FcγR o CR3 (Olazabal y col. 2002). La isoforma principal  
947 en células no musculares es la MNM II cuya actividad puede ser estudiada mediante el uso de  
948 inhibidores farmacológicos. Uno de ellos es blebistatina, una pequeña molécula con alta afinidad  
949 y selectividad por MNM II. Su mecanismo de acción se produce a través de la interacción con el  
950 dominio ATPasa de MNM II cuando se encuentra unido a ADP. Esto produce una baja afinidad de  
951 la “cabeza” de miosina por actina (Kovács y col. 2004). Por esta razón, se seleccionó esta droga  
952 para estudiar el rol de MNM II en la internalización de *C. burnetii*. Para ello células HeLa se trataron  
953 durante una hora con blebistatina o dimetilsulfoxido (DMSO) como control, y luego se infectaron  
954 6 horas en presencia del inhibidor. Las células se fijaron, se incubaron con Faloidina-Rodamina  
955 para marcar los microfilamentos, se procesaron para IFI para determinar las bacterias  
956 intracelulares y extracelulares empleando anticuerpos contra *C. burnetii* y se analizaron por  
957 microscopía de fluorescencia confocal. Las concentraciones utilizadas (25, 50 y 100 μM) se  
958 definieron en base a estudios previos de fagocitosis (Lee y col. 2011), de internalización de  
959 *Salmonella Typhimurium* por células HeLa (Hänisch y col. 2011) y del análisis de citotoxicidad de  
960 blebistatina en cultivos celulares (Zhang y Rao 2005).

961 Como se puede observar en la figura 16.A.a, las células tratadas con DMSO mostraron  
962 una gran cantidad de fibras de estrés marcadas con Faloidina Rodamina (pseudocolor rojo). Por  
963 otro lado, se observó una notable disminución de estas estructuras fibrosas incluso a la menor  
964 concentración de blebistatina (25 μM) (16.A.f), efecto que se acentuó significativamente al  
965 incrementar los niveles de la droga (16.A.k y 16.A.o). Además, se observaron cambios en la  
966 morfología celular y una disminución importante de la corteza de actina. Todas estas  
967 modificaciones confirmaron el efecto del tratamiento con blebistatina sobre las células. Con

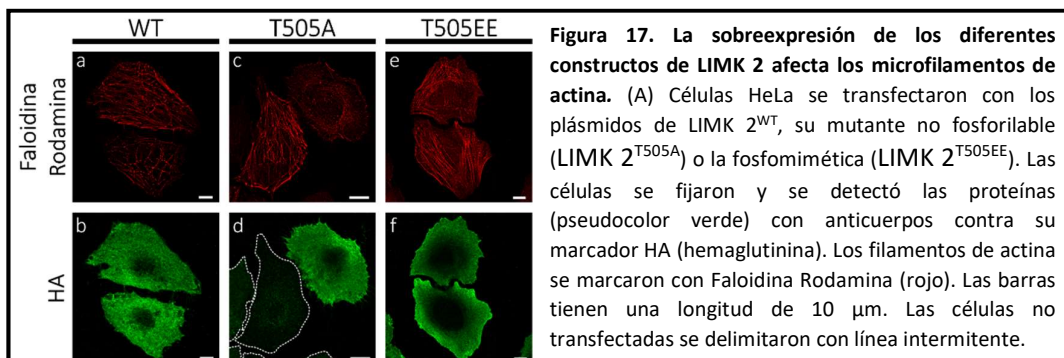
relación a la internalización de *C. burnetii*, se produjo una disminución significativa en células tratadas con una concentración de blebistatina 25  $\mu$ M respecto al control (DMSO). Este efecto inhibitorio se mantuvo constante a concentraciones mayores como 50 y 100  $\mu$ M (figura 16.B). El tratamiento no afectó la adherencia de *C. burnetii* a la célula hospedadora ya que el número de bacterias totales no muestra diferencias en presencia de distintas concentraciones del inhibidor y del control (DMSO) (figura 16.C). Estos resultados sugieren que MNM II participa en la internalización de *C. burnetii* a la célula hospedadora.



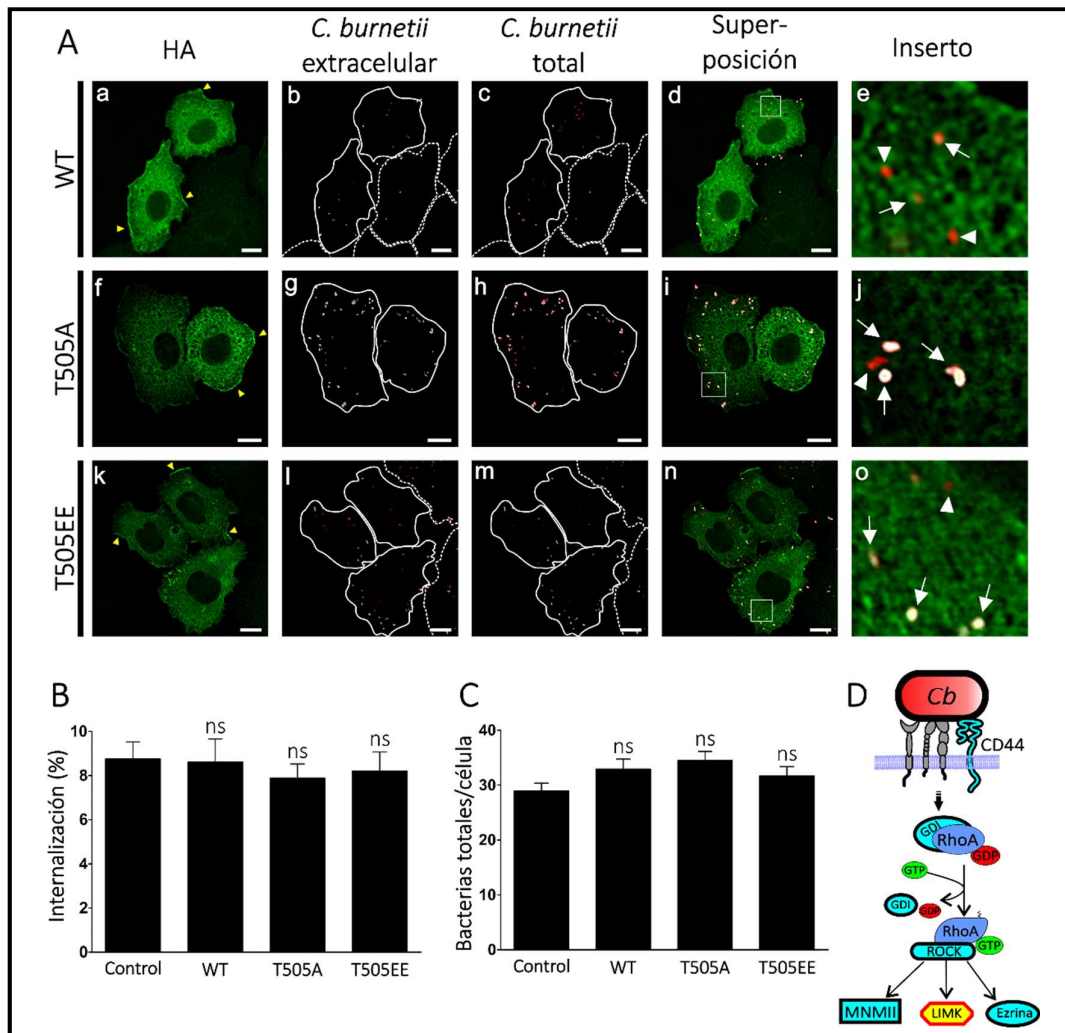
**Figura 16. La inhibición farmacológica de MNMII afecta la internalización de *C. burnetii*.** (A) Células HeLa se trataron con Blebistatina durante una hora. Posteriormente se infectaron por 6 h e incubaron con la droga durante todo el periodo la infección. Terminado el proceso, las células se fijaron e incubaron con Faloidina-Rodamina para observar estructuras de actina y límites celulares (pseudocolor rojo). Las bacterias extracelulares (marca doble pseudocolores verde y blanco) e intracelulares (pseudocolor verde solamente) fueron detectadas por IFI. Las flechas en el inserto indican las bacterias adheridas y las puntas de flechas las internalizadas. Las barras y los insertos tienen una longitud de 20  $\mu$ m. Las células se delimitaron con línea sólida. (B) Cuantificación y análisis estadístico del porcentaje de *C. burnetii* internalizadas y (C) bacterias totales por célula. En ambos casos se muestran los valores promedio  $\pm$ SEM obtenidos a partir de tres ensayos independientes, contando 100 células por ensayo. ns = no significativo; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . (D) Esquema de la vía de señalización estudiada donde se resalta en color amarillo y borde rojo la molécula analizada en esta figura.

### III.1.3 LIMK 2 no interviene en el proceso de internalización de *Coxiella burnetii*

Las kinasas LIM, como se menciona en la introducción, pueden encontrarse en dos isoformas conocidas como LIMK 1 y LIMK 2. Ambas son expresadas de forma ubicua en los diferentes tejidos de mamíferos. A nivel subcelular LIMK 1 suele encontrarse asociada a adhesiones focales, mientras que LIMK 2 muestra una distribución puntiforme en el citoplasma. Estas proteínas una vez activas pueden fosforilar a cofilina e inhibir de esta forma la despolimerización de los filamentos de actina produciendo un aumento de microfilamentos en la célula (Acevedo y col. 2006). Como se detalla previamente, las dos isoformas son reguladas mediante la fosforilación de un residuo treonina en la posición 508 en LIMK 1 o 505 en LIMK 2. Ambas kinasas pueden ser activadas por la vía de señalización de RhoA/ROCK, sin embargo, existen diferencias en dicha regulación. Se ha observado que la sobreexpresión, en células HeLa, de una forma constitutivamente activa de ROCK es capaz de fosforilar a ambas kinasas mientras que la proteína salvaje solo actúa sobre LIMK 2. La región C-terminal de ROCK sería la encargada de otorgarle la especificidad por LIMK 2 (Tomoyuki y col. 2001).



990 En primer lugar, se determinó el efecto de la sobreexpresión de LIMK 2 en el citoesqueleto  
 991 de actina. Para ello células HeLa fueron transfectadas con los plásmidos que codifican la proteína  
 992 salvaje (LIMK 2<sup>WT</sup>), una mutante puntual inactiva (LIMK 2<sup>T505A</sup>), que no puede ser fosforilada por  
 993 ROCK, o una forma fosfomimética (LIMK 2<sup>T505EE</sup>) con actividad permanente. Luego las células se  
 994 fijaron, incubaron con Faloidina Rodamina para marcar actina-F, se procesaron para  
 995 inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos anti-HA para detectar las proteínas  
 996 sobreexpresadas y se observaron por microscopía confocal (figura 17). Como se puede observar  
 997 en células que sobreexpresan la proteína salvaje se pueden observar filamentos de actina típicos  
 998 y fibras de estrés marcados y gruesos (17.a), en aquellas que sobreexpresan la forma no  
 999 fosforilable disminuye el número de fibras de estrés (17.c) y en las que sobreexpresan la mutante  
 1000 LIMK 2<sup>T505EE</sup> se genera una mayor cantidad de estas estructuras, pero de apariencia más delgada  
 1001 (17.e). Estas observaciones coinciden con lo determinado previamente (Tomoyuki y col. 1999;  
 1002 Tomoyuki y col. 2001).





**Figura 18. LIMK 2 no es necesaria para el ingreso de *C. burnetii* a la célula hospedadora.** (A) Células HeLa se transfectaron con los constructos que codifican el vector vacío EGFP (control), la proteína salvaje (LIMK 2<sup>WT</sup>), una mutante puntual inactiva (LIMK 2<sup>T505A</sup>) o una forma fosfomimética (LIMK 2<sup>T505EE</sup>) de LIMK 2 e infectaron por seis horas con *C. burnetii*. Las muestras se procesaron para IFI y se observan LIMK 2<sup>WT</sup> y sus formas mutantes en pseudocolor verde. En este caso las bacterias extracelulares presentan doble marca en pseudocolor rojo y blanco mientras que las que fueron internalizadas solo rojo. Las barras y los insertos tienen una longitud de 10 µm. Las células transfectadas se delimitaron con línea sólida y las que no lo hicieron con trazo discontinuo. Las flechas en el inserto indican bacterias adheridas y las puntas de flechas internalizadas. Las puntas de flecha de color amarillo indican regiones puntuales de la membrana donde se observa la proteína. (B) Cuantificación y análisis estadístico del porcentaje de *C. burnetii* internalizadas y (C) bacterias totales por célula. Se muestran los valores promedio ±SEM obtenidos a partir de tres ensayos independientes, contando 30 células por ensayo. ns = no significativo. (D) Esquema de la vía de señalización estudiada donde se resalta en color amarillo y borde rojo la molécula analizada en esta figura.

1003 Para analizar el efecto de LIMK 2 en la internalización de *C. burnetii* se procedió de manera  
 1004 similar, pero en este caso las células se infectaron por 6 horas con *C. burnetii*. Terminada la  
 1005 incubación, las células se fijaron, se procesaron para IFI para determinar las proteínas  
 1006 sobreexpresadas con anticuerpos específicos para el “tag” HA, y las bacterias intracelulares y  
 1007 extracelulares empleando anticuerpos contra *C. burnetii*. Las células se analizaron por microscopía  
 1008 de fluorescencia confocal.

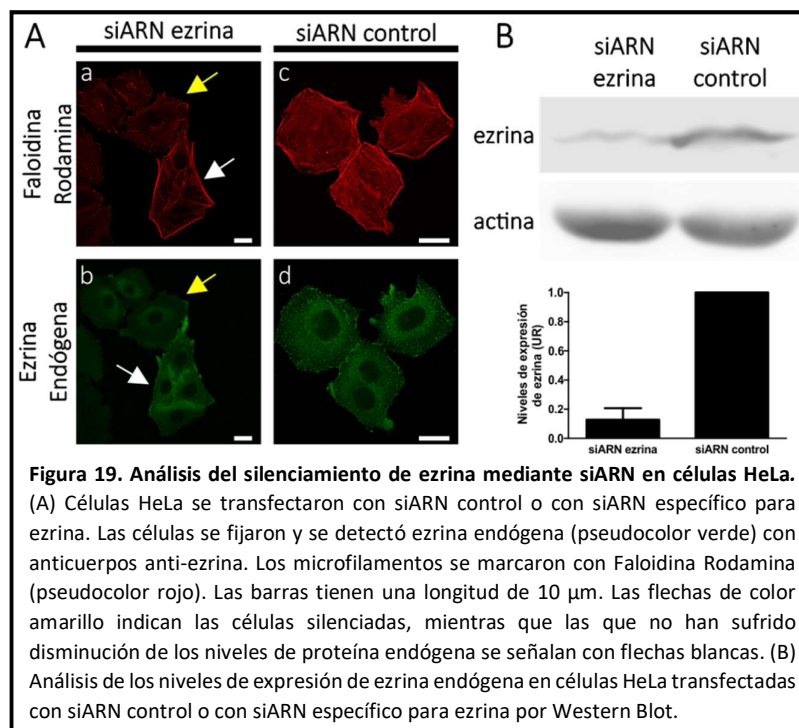
1009 En la primera columna de la figura 18.A se puede observar que las proteínas  
 1010 sobreexpresadas (pseudocolor verde) se ubican principalmente a nivel del citoplasma y, en menor  
 1011 medida, en algunas regiones membranosas (puntas de flechas amarillas) como se ha observado  
 1012 en otras publicaciones (Amano y col. 2001; Sumi y col. 1999). Respecto al proceso de infección, no  
 1013 se observaron diferencias significativas en los porcentajes de bacterias internalizadas tanto en  
 1014 células que sobreexpresaron LIMK 2<sup>WT</sup> o sus mutantes al compararlos con lo observado en las  
 1015 células control (transfectadas con el vector EGFP vacío) (figura 18.B). Tampoco fue afectado el  
 1016 número de bacterias totales y, consecuentemente, la adhesión a la célula hospedadora (figura  
 1017 18.C). En base a estos resultados podemos concluir que LIMK 2 no participaría del proceso de  
 1018 internalización de *C. burnetii*.

### 1019 III.1.4 Ezrina actúa durante la internalización de *Coxiella* 1020 *burnetii*

1021 Las proteínas ERM, como se menciona previamente, permiten el anclaje de filamentos de  
 1022 actina a membrana. Por esta razón se encuentran implicadas en una amplia variedad de procesos  
 1023 celulares asociados a membranas, sin embargo, su participación en la fagocitosis está poco  
 1024 estudiada. Se ha observado que ezrina es reclutada a la membrana plasmática tempranamente

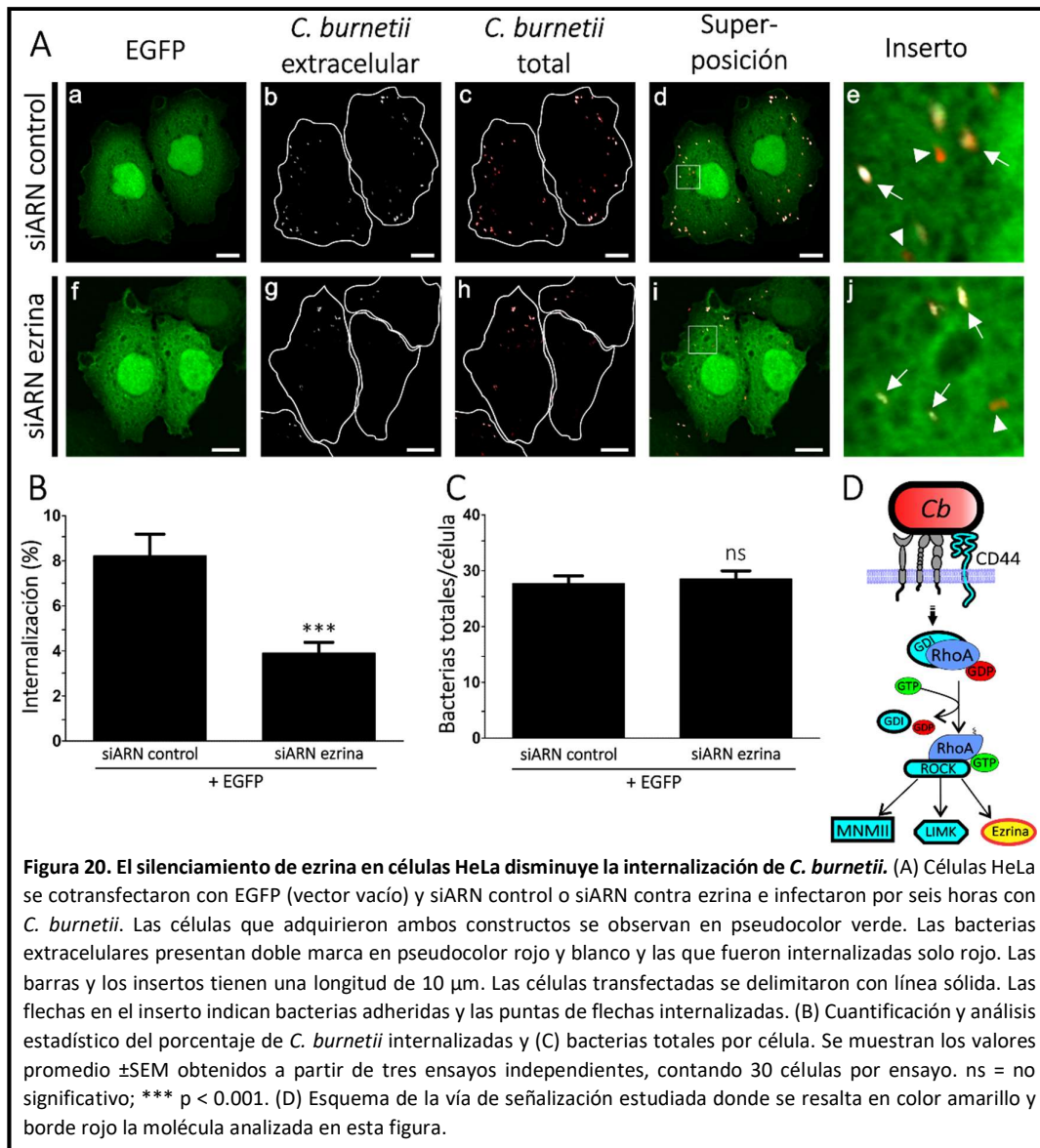


1025 durante la fagocitosis medida por receptores Fc (Diakonova y col. 2002). Además, Marion y  
 1026 colaboradores (2011) demostraron que ezrina interacciona, a través de su dominio FERM, con el  
 1027 factor promotor de la nucleación de acina N-WASP en fagosomas purificados. Esta interacción  
 1028 permite el ensamblaje del complejo Arp2/3, la consecuente polimerización y anclaje de  
 1029 microfilamentos de actina en la membrana del fagosoma, *in vitro* (Defacque y col. 2000; Defacque  
 1030 y col. 2002). Además, como se detalló previamente, ezrina interviene en la internalización de  
 1031 diversos patógenos como *S. flexneri*, *C. trachomatis*, *E. coli*, *B. abortus* y *N. meningitidis*.



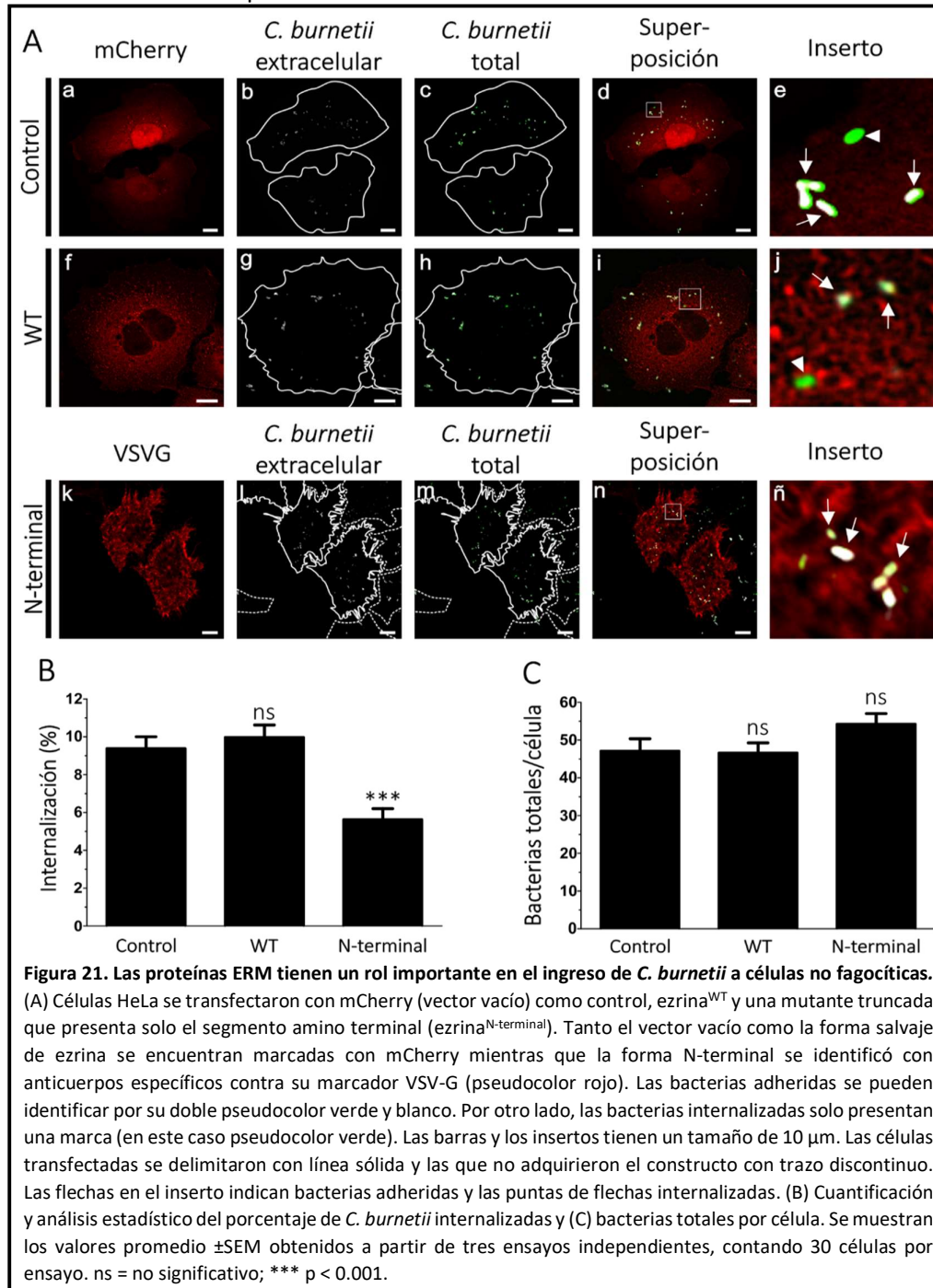
1032 En base a lo expuesto anteriormente decidimos analizar el rol de ezrina durante etapas  
 1033 tempranas de la internalización de *C. burnetii*. En primer lugar, se silenció la proteína en células  
 1034 HeLa empleando la tecnología de ARN interferente (siARN). Para ello, células HeLa se  
 1035 transfectaron con siARN control ("scrambled") o con siARN específico contra ezrina. Luego las  
 1036 células se fijaron, procesaron para IFI utilizando Faloidina-Rodamina, para marcar los  
 1037 microfilamentos, y un anticuerpo contra ezrina. Los preparados se analizaron por microscopía  
 1038 confocal. Como se observa en las imágenes de la figura 19.A las células silenciadas (marcadas con  
 1039 flechas amarillas) presentan una disminución notable de la corteza de actina (pseudocolor rojo del  
 1040 panel 19.A.a) y una intensidad de fluorescencia de ezrina endógena muy baja (pseudocolor verde  
 1041 del panel 19.A.b). Por otro lado, las células no transfectadas (indicadas con flechas blancas)  
 1042 muestran un citoesqueleto de actina (19.A.c) y una expresión de ezrina endógena (19.A.d) típicos.

Además, la distribución de la proteína en el citoplasma y ciertas estructuras de membrana como microvellosidades (19.A.b y 19.A.d) coincide con lo observado en otros trabajos (Auvinen y col. 2007). La figura 19.B representa experimentos similares pero las células se procesaron para “Western Blot” utilizando un anticuerpo anti-ezrina. Se observa la disminución de la expresión de ezrina en células tratadas con siARN contra ezrina en comparación a células tratadas con siARN control (“scramble”).



Para determinar el efecto del silenciamiento de ezrina sobre el proceso de internalización de *C. burnetii* células HeLa fueron cotransfectadas con EGFP y un siARN específico para ezrina o un siARN control (“scrambled”) e infectadas por 6 horas. Como se observa en la figura 20.B el porcentaje de internalización de la bacteria disminuyó más de un 50% tras el silenciamiento de

1053 ezrina. El número de bacterias totales, sin embargo, se mantuvo constante en ambas condiciones  
 1054 (figura 20.C). Estos resultados indica que ezrina está involucrada en el proceso de internalización  
 1055 de *C. burnetii* ya que la falta de la proteína impide significativamente el ingreso de la bacteria. Se  
 1056 debe tener en cuenta que la forma endógena de moesina y radixina aún permanecen en la célula  
 1057 pudiendo actuar en reemplazo de ezrina.



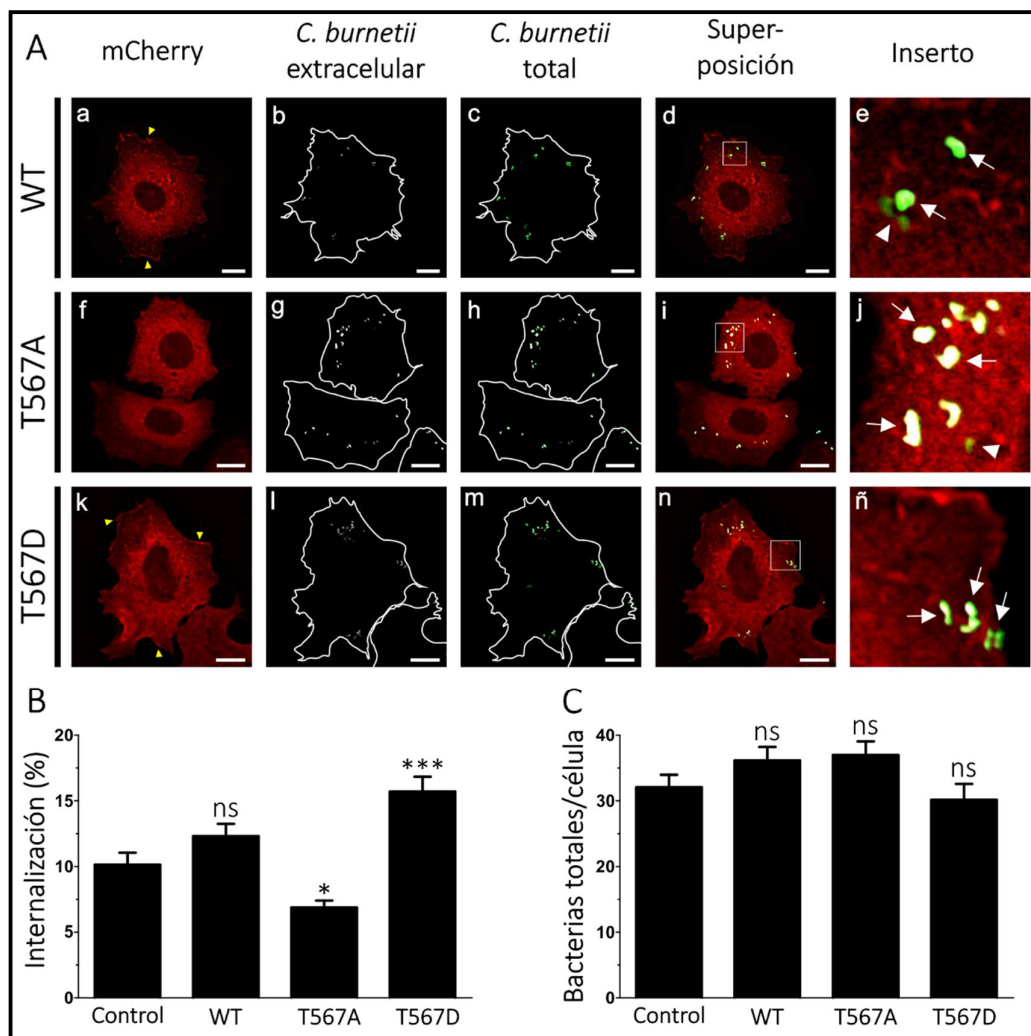
1058 Para corroborar estos resultados se trabajó con plásmidos que codifican el vector vacío  
 1059 mCherry (control), la forma salvaje de ezrina (ezrina<sup>WT</sup>) y una mutante truncada que presenta solo

1060 el segmento amino terminal (ezrina<sup>N-terminal</sup>). Luego las células se infectaron con *C. burnetii* durante  
1061 6 horas. Terminado este lapso de tiempo las células se fijaron y procesaron para IFI. Ezrina<sup>WT</sup> y el  
1062 vector control se encuentran fusionadas a mCherry mientras que ezrina<sup>N-terminal</sup> se identificó con  
1063 anticuerpos específicos contra su marcador VSV-G. La forma salvaje se distribuyó entre el  
1064 citoplasma y ciertas estructuras de membrana (pseudocolor rojo del panel 21.A.f). En el caso de la  
1065 mutante ezrina<sup>N-terminal</sup> se observó una menor presencia en el citoplasma con predominio en  
1066 estructuras membranosas generando un mayor número de filopodios coincidiendo con lo  
1067 descrito por otros autores (Auvinen y col. 2007; Algrain y col. 1993) (figura 21.A.k). La  
1068 sobreexpresión de la forma truncada produce un efecto dominante negativo en la actividad de la  
1069 proteína endógena. El fragmento N-terminal interacciona con la región C-ERMAD de las ERM  
1070 impidiendo su interacción con los filamentos de actina (Roy y col. 1997). Además, compite por los  
1071 sitios de unión a receptores de membrana desacoplándolos del citoesqueleto de actina (Martinelli  
1072 y col. 2013). Como se puede observar en la figura 21.B y C la mutante ezrina<sup>N-terminal</sup> disminuye de  
1073 forma significativa la internalización de *C. burnetii* sin afectar su adherencia al hospedador. En el  
1074 caso de la sobreexpresión de ezrina<sup>WT</sup> no se produjo variación en los niveles de ingreso de la  
1075 bacteria ni en los valores totales respecto al control (vector vacío mCherry). Esto refuerza los  
1076 resultados obtenidos mediante silenciamiento por ARN interferente indicando que ezrina es  
1077 importante para la internalización de *C. burnetii* y que en dicho proceso podrían participar otros  
1078 miembros de la familia como radixina y moesina.

### 1079 III.1.5 La fosforilación de ezrina es necesaria para la internalización 1080 de *Coxiella burnetii*

1081 Como se menciona previamente, la fosforilación de ezrina en su residuo treonina 567 es  
1082 fundamental para estabilizar su estado desplegado y activo en la membrana diana. Además, como  
1083 se demuestra en las figuras 20 y 21 la proteína participa durante etapas tempranas de la  
1084 internalización de *C. burnetii*. En base a ello es que se determinó si la fosforilación del residuo 567  
1085 de ezrina es necesaria para el ingreso de la bacteria a la célula hospedadora. Para esto células HeLa  
1086 se transfectaron con mCherry-vector, ezrina<sup>WT</sup>, ezrina<sup>T567A</sup> o ezrina<sup>T567D</sup> e infectaron durante 6  
1087 horas. Posteriormente, las células se fijaron, se procesaron para IFI para determinar las bacterias  
1088 intracelulares y extracelulares empleando anticuerpos contra *C. burnetii*. El análisis de los  
1089 preparados se realizó por microscopía de fluorescencia confocal.

La mutante de ezrina T567A es inactiva porque es incapaz de ser fosforilada por kinasas y la forma T567D imita un estado de fosforilación permanente por lo que es activa (fosfomimética). La manera en que actúan y cómo se comportan estos constructos, al ser transfectados en cultivos celulares, ha sido descrita en trabajos previos (Zhu y col. 2007; Gautreau y col. 2000). Así, la proteína WT y la mutante T567A se mantienen principalmente en un estado latente inactivo por interacción de su dominio FERM con su segmento C-terminal. A pesar de encontrarse en dicho estado ambas proteínas son capaces de interaccionar con membranas a través de su dominio N-terminal, pero solo la forma WT puede unirse a filamentos de actina si es fosforilada. La mutante pseudofosforilada T567D, en cambio, se encuentra en su conformación desplegada y activa de forma permanente.



**Figura 22. La fosforilación de ezrina en su residuo 567 cumple un rol clave en la internalización de *C. burnetii*.** (A) Células HeLa se transfectaron con mCherry (vector vacío) como control, ezrina WT, la mutante incapaz de ser fosforilada (T567A) y la forma fosfomimética (T567D). La expresión de las diferentes proteínas se observa gracias a su marcador mCherry (pseudocolor rojo). Las bacterias adheridas se pueden identificar por su doble pseudocolor verde y blanco. Por otro lado, las bacterias internalizadas solo presentan una única marca (pseudocolor verde). Las barras y los insertos tienen un tamaño de 10  $\mu$ m. Las células transfectadas se delimitaron con línea sólida. En el inserto, las flechas indican bacterias adheridas a la célula hospedadora y las puntas de flechas aquellas que han sido internalizadas. (B) Cuantificación y análisis estadístico del porcentaje de *C. burnetii* internalizadas y (C) bacterias totales por célula. Se muestran los valores promedio  $\pm$ SEM obtenidos a partir de tres ensayos independientes, contando 30 células por ensayo. ns = no significativo; \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

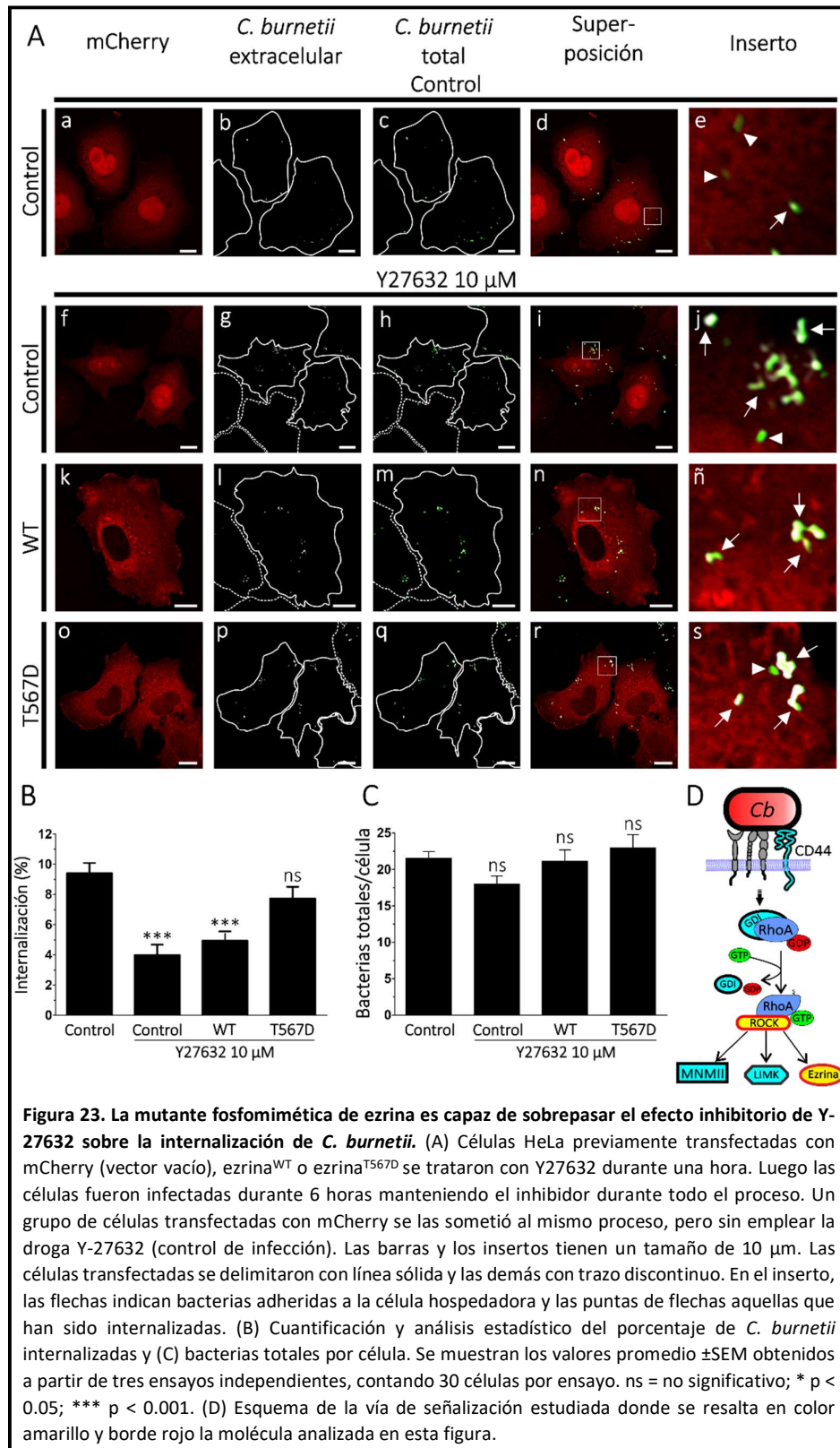
1100 En concordancia con el trabajo de Gautreau y colaboradores (2000), en la figura 22.A  
1101 (primera columna) se observa que la distribución subcelular de los diferentes constructos es  
1102 similar encontrándose principalmente a nivel del citoplasma. Sin embargo, las formas WT y T567D  
1103 se reclutan también, en menor medida, a estructuras formadas por actina-F como filopodios y  
1104 “ruffles” (ondulaciones dorsales de membrana) (figura 22.A, punta de flecha amarilla de los  
1105 paneles a y k). La internalización de *C. burnetii* fue inhibida por la sobreexpresión de la mutante  
1106 T567A mostrando una disminución de aproximadamente el 40% respecto al control (mCherry-  
1107 vector). La forma pseudofosforilada T567D por el contrario produjo un aumento considerable  
1108 (50%) en el número de bacterias internalizadas en comparación a células que sobreexpresan el  
1109 constructo vacío (figura 22B). Finalmente, como se observa en la figura 22C, el número de  
1110 bacterias totales no se modificó por efecto de los diferentes constructos expresados al  
1111 compararlas con el control (mCherry-vector). En conjunto estos resultados indican que el ingreso  
1112 de la bacteria depende de la fosforilación del residuo treonina 567 y la consecuente activación de  
1113 ezrina.

### 1114 III.1.6 Rol de ezrina en la vía de señalización de ROCK durante la 1115 internalización de *Coxiella burnetii*

1116 Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demostraron la participación de ROCK  
1117 en el proceso de internalización de *C. burnetii* (Salinas y col. 2015). Además, como se menciona  
1118 anteriormente, esta kinasa es capaz de regular a ezrina a través de su fosforilación. Debido a que  
1119 este proceso es importante para el ingreso de la bacteria (figura 22), se analizó el efecto de la  
1120 sobreexpresión de ezrina WT y su mutante fosfomimética en células tratadas con Y-27632  
1121 (inhibidor específico de ROCK). Para ello células, HeLa fueron transfectadas con los plásmidos que  
1122 codifican el vector mCherry vacío, ezrina<sup>WT</sup> o ezrina<sup>T567D</sup>. Posteriormente, las células fueron  
1123 tratadas durante una hora con Y-27632 e infectadas por 6 horas en presencia del inhibidor. La



1124 concentración de Y-27632 empleada (10  $\mu$ M) fue seleccionada de trabajos previos de nuestro  
 1125 laboratorio (Salinas y col. 2015).



En figura 23 se puede observar que la droga no induce cambios morfológicos notables en las células (primera columna del panel 23.A). Interesantemente, la distribución de la forma WT y la mutante T567D es similar a la observada en figura 22.A a pesar de la presencia del inhibidor de ROCK. La droga produce una disminución considerable de los porcentajes de *C. burnetii* internalizadas en células que sobreexpresan mCherry-vector o ezrina<sup>WT</sup> (figura 23.B). Interesantemente, la forma fosfomimética puede recuperar casi completamente el número de bacterias internalizadas respecto a las células control (vector vacío) sin tratamiento de Y-27632. Por otro lado, en todos los casos el número de bacterias totales se mantuvo sin cambios significativos por lo que ni el inhibidor ni la transfección afectan la adhesión de la bacteria (figura 22.C). La recuperación de la internalización por parte de la mutante de ezrina fosfomimética en presencia del inhibidor de ROCK era lo esperado ya que esta mutante estaría por debajo de la kinasa en la vía de señalización. Además, sugiere que ezrina se comportaría como sustrato de ROCK. Sin embargo, no podemos descartar que otras kinasas, como las mencionadas en la sección I.1.8, podrían estar participando de la fosforilación de ezrina.

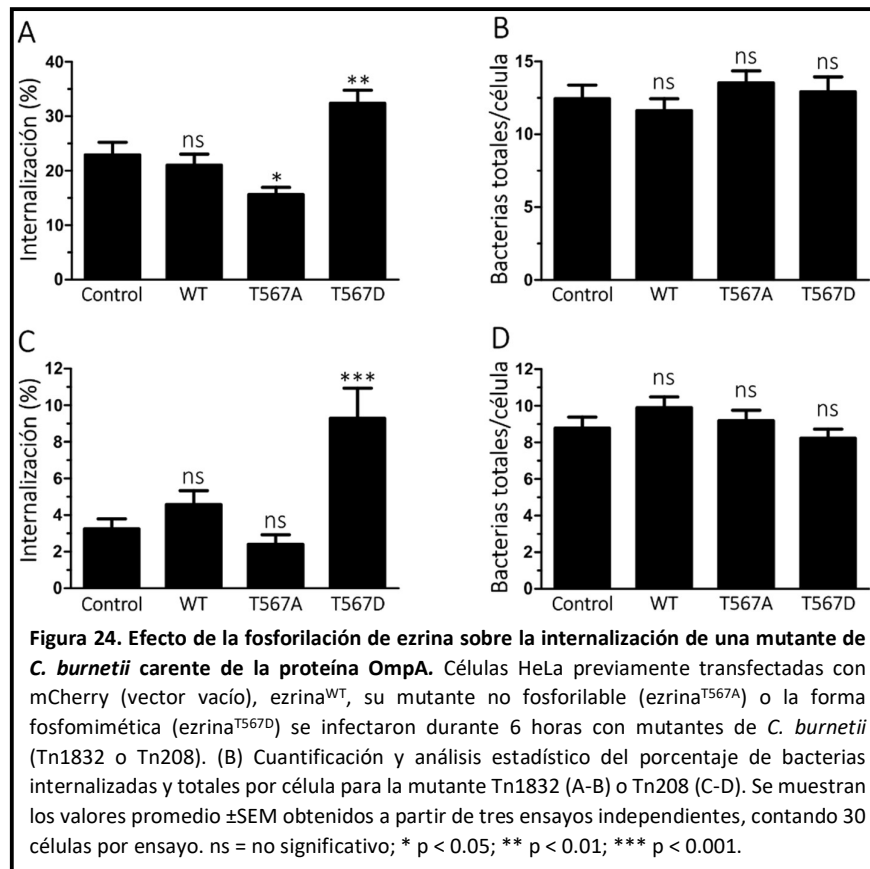
### III.1.7 Relación de ezrina con la invasina OmpA de *Coxiella burnetii*

Una gran variedad de bacterias contiene en su membrana externa proteínas que participan en su adherencia y/o internalización conocidas como OmpA (“outer membrane protein A”) (Serino y col. 2007; Namba y col. 2008; Bartra y col. 2012; Mahawar y col. 2012). El genoma de *C. burnetii* codifica tres posibles productos con dominios similares a proteínas de membrana externa: CBU\_0307, CBU\_0936 y CBU\_1260. Un estudio reciente estableció al CBU\_1260 como la primera proteína de superficie de la bacteria implicada en el proceso de internalización actuando como una invasina a la que se la denominó OmpA. Esta proteína es fundamental para la internalización de *C. burnetii* a células no fagocíticas pero se ha determinado que no participa en su asociación (Martinez y col. 2014).

Debido a la importancia que muestra OmpA en la internalización de *C. burnetii*, se analizó su relación con ezrina durante dicho proceso. Se trabajó con dos mutantes de *C. burnetii*, una de ellas expresa de forma correcta OmpA en su membrana externa (Tn1832) mientras que la segunda carece de la invasina OmpA (Tn208). Células HeLa fueron infectadas con Tn1832 (control) o Tn208, como se indica en la metodología, luego de ser transfectadas con los constructos ezrina<sup>WT</sup>, ezrina<sup>T567A</sup> y ezrina<sup>T567D</sup>. Como control de transfección se empleó el vector vacío mCherry.



1156 Como se puede observar en la figura 24.A la mutante de *C. burnetii* Tn1832 mostró una eficiencia  
 1157 de internalización similar a lo determinado previamente con la cepa salvaje de *C. burnetii*. De esta  
 1158 manera las células que sobreexpresaban ezrina WT internalizaron una cantidad de bacterias  
 1159 Tn1832 similar a las células control que sobreexpresaron el vector vacío mCherry. La mutante  
 1160 T567A produjo una disminución del 32% en los porcentajes de internalización mientras que la  
 1161 forma T567D generó un efecto opuesto observándose un incremento del 41% respecto a las  
 1162 células control (vector mCherry) (figura 24.A). En las infecciones con la cepa de *C. burnetii* Tn208  
 1163 se observaron menores porcentajes de infección en comparación con la Tn1832 de la bacteria,  
 1164 debido a la falta de la invasina OmpA. Interesantemente, la mutante negativa de ezrina T567A  
 1165 produjo una leve disminución en la internalización de la cepa Tn208 de *C. burnetii* sin ser  
 1166 significativa estadísticamente. La forma pseudofosforilada de ezrina, por otro lado, triplicó el  
 1167 ingreso de bacterias Tn208 a la célula hospedadora (figura 24.C). La adherencia de ambas  
 1168 mutantes no fue afectada por la sobreexpresión de ninguno de los plásmidos empleados (figura  
 1169 24.B y 24.D), coincidiendo con lo observado por Martinez y colaboradores (2014). Estos resultados  
 1170 indican que ezrina podría ser importante para la estimulación de la internalización de *C. burnetii*  
 1171 mediada por OmpA.

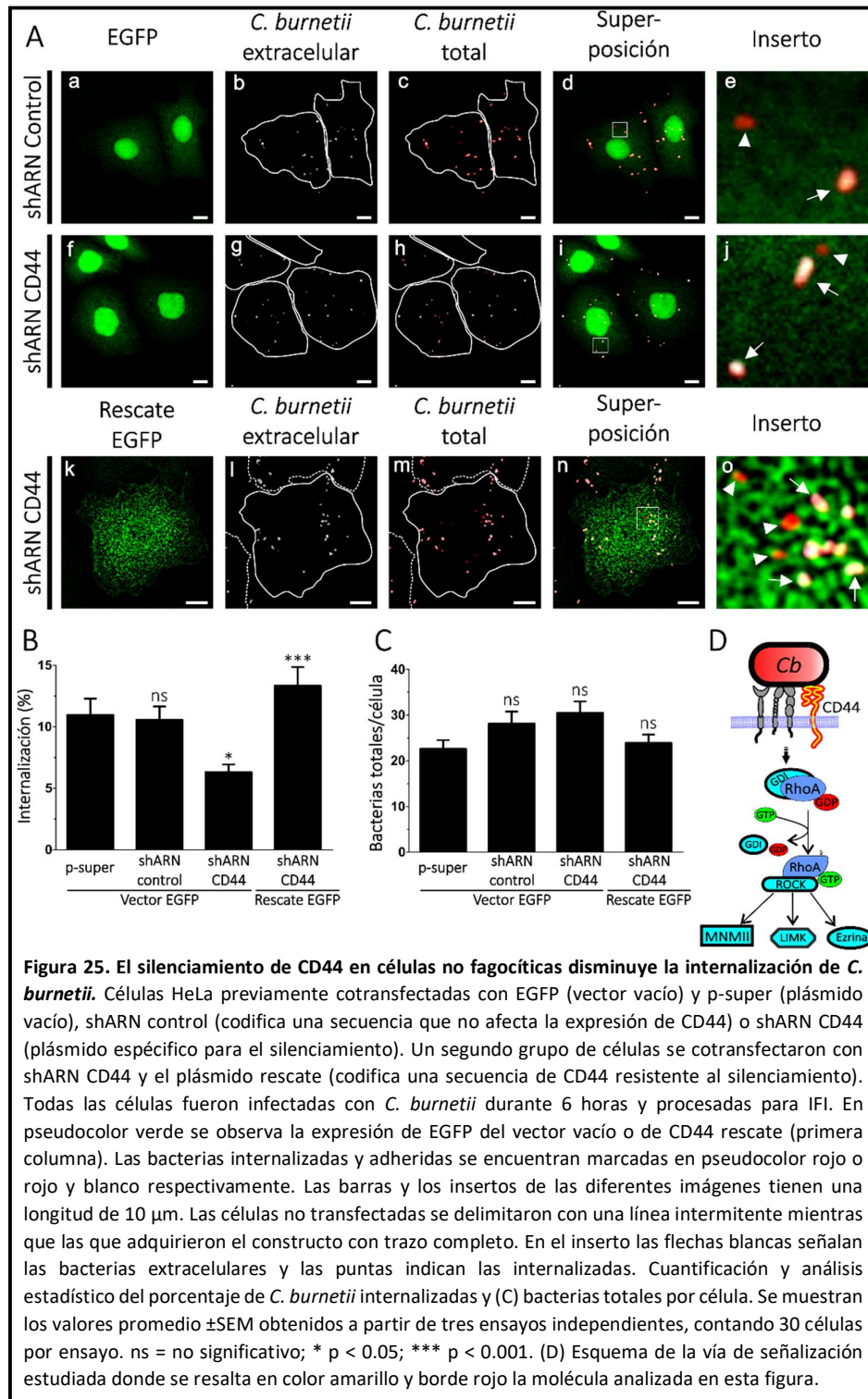


### 1172 III.1.8 El receptor CD44 forma parte del proceso de internalización 1173 de *Coxiella burnetii*

1174 En nuestro laboratorio se ha determinado la participación de diferentes moléculas  
1175 relacionadas al citoesqueleto de actina en la internalización de *C. burnetii* (Rosales y col. 2012;  
1176 Salinas y col. 2015). Sin embargo, aún permanecen poco descriptos los receptores implicados en  
1177 el ingreso de la bacteria a la célula hospedadora. La infección de células epiteliales (A-431) con *C.*  
1178 *burnetii* en presencia de anticuerpos específicos contra OmpA o bien la exposición previa de la  
1179 célula a la proteína purificada disminuyen la internalización de la bacteria. Es por ello que se  
1180 postula la presencia, en la célula hospedadora, de un receptor relacionado a la invasina OmpA  
1181 (Martinez y col. 2014). En monocitos/macrófagos *C. burnetii* emplea  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_M\beta_2$  para su  
1182 internalización, sin embargo en células no fagocíticas solo se encontrarían presentes las integrinas  
1183  $\alpha_v\beta_3$  (Capo y col. 1999; Gilk y col. 2013). La entrada de *C. burnetii* a través de esta molécula  
1184 depende de la presencia de colesterol y se postula por ello que se desarrolla en los dominios de  
1185 membrana ricos en dicho lípido denominados “balsas lipídicas” (“lipid rafts”)(Gilk y col. 2013). Un  
1186 receptor íntimamente relacionado a estas estructuras de membrana es la glicoproteína CD44 que  
1187 a su vez puede actuar como receptor fagocítico y desencadenar, de forma independiente a  
1188 receptores clásico (FcγR y CR3), la ingesta de una partícula. Este proceso es regulado por el  
1189 citoesqueleto de actina y las GTPasas Rho (Vachon y col. 2006). Además, se ha demostrado que  
1190 puede funcionar como un co-receptor estimulando la fagocitosis mediada por FcγR y CR3 (Amash  
1191 y col. 2016; Vachon y col. 2007). Para estudiar la posible participación de CD44 en la entrada de la  
1192 cepa salvaje de *C. burnetii* se llevó a cabo el silenciamiento del receptor. Para ello células HeLa se  
1193 cotransfectaron con EGFP y los siguientes plásmidos: p-super (vector vacío), shARN control (ARN  
1194 pequeño que no afecta la expresión del receptor) y shARN CD44 (ARN pequeño que induce el  
1195 silenciamiento de CD44). Otro grupo de células se transfectó con shARN CD44 y shARN rescate  
1196 (forma de CD44 resistente al silenciamiento). El vector shARN rescate se encuentra fusionado a  
1197 EGFP para poder detectar su expresión. Las células se fijaron, se procesaron para IFI para  
1198 determinar las bacterias intracelulares y extracelulares empleando anticuerpos contra *C. burnetii*  
1199 y se analizaron por microscopía de fluorescencia confocal.

1200 Como se puede observar en la figura 25.A y 25.B, al silenciar CD44 se produjo una  
1201 disminución significativa en el porcentaje de internalización de *C. burnetii* comparada con las  
1202 células que expresaron shARN control o el vector p-super vacío. Además, en aquellas células que

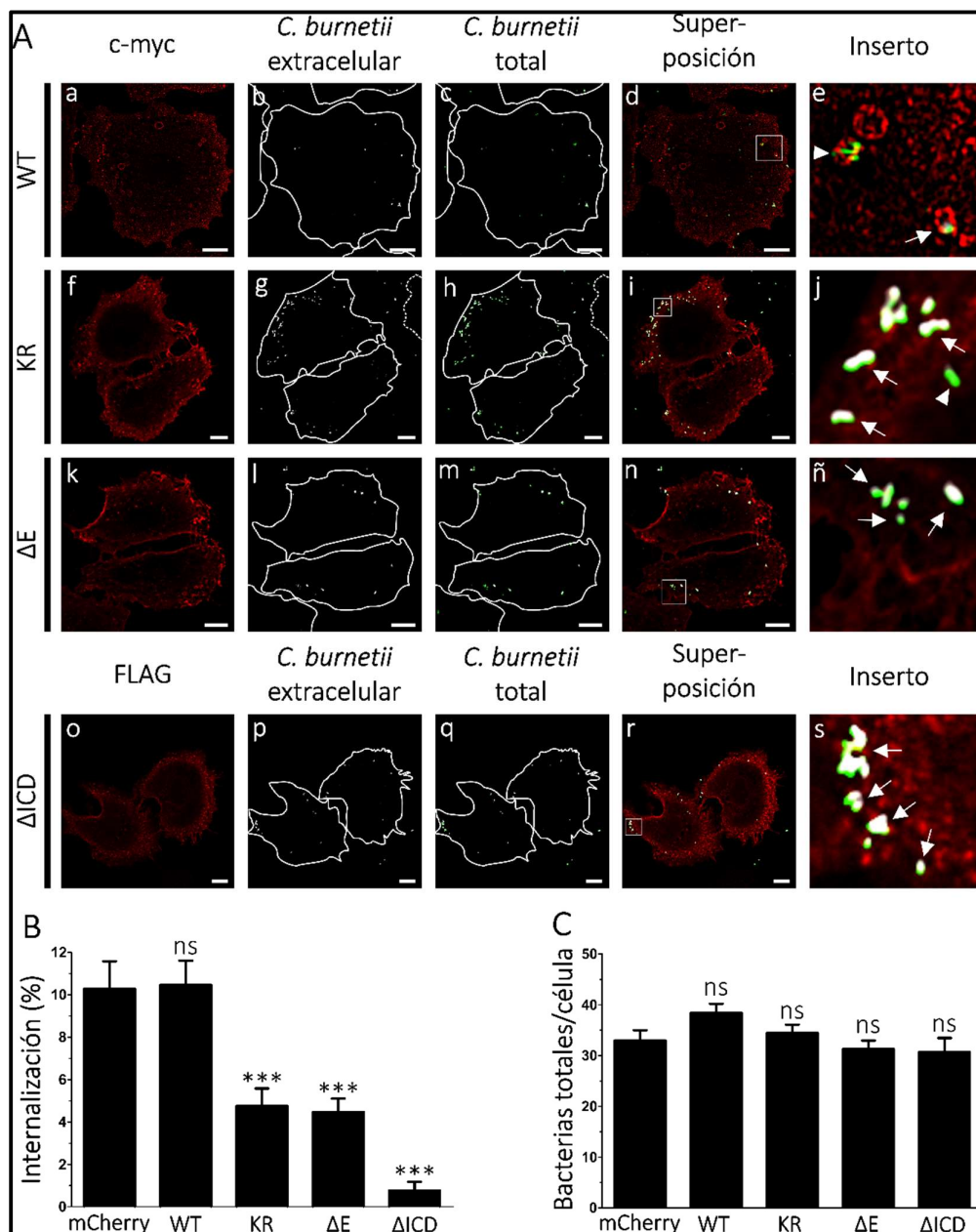
1203 sobreexpresaban la forma resistente del receptor se reestableció el número de bacterias  
 1204 internalizadas. Los niveles de bacterias totales por célula no se vieron afectados por los  
 1205 tratamientos realizados (figura 25.C).



1206 A nivel molecular CD44 presenta una región extracelular, un segmento transmembrana y  
1207 un dominio intracelular capaz de interaccionar con proteínas de unión a actina como ezrina y  
1208 ankirina. Para complementar los resultados obtenidos previamente por el silenciamiento de  
1209 CD44, se estudió el efecto de la expresión de la forma WT y diferentes mutantes del receptor. Se  
1210 trabajó con células HeLa las cuales fueron transfectadas con plásmidos que codifica CD44<sup>WT</sup>,  
1211 CD44<sup>KR</sup> (forma completa con una mutación que impide su interacción con ezrina), CD44<sup>ΔE</sup> (forma  
1212 que carece del segmento extracelular) o CD44<sup>ΔCD</sup> (forma que no presenta el segmento  
1213 intracelular) e infectadas con *C. burnetii* durante 6 horas. Las células se fijaron, se procesaron para  
1214 IFI para determinar las bacterias intracelulares y extracelulares empleando anticuerpos contra *C.*  
1215 *burnetii*. Las diferentes formas de CD44 se detectaron con anticuerpos anti-FLAG (segmento  
1216 extracelular) o anti-c-myc (segmentos intracelulares). Las células se analizaron por microscopía de  
1217 fluorescencia confocal.

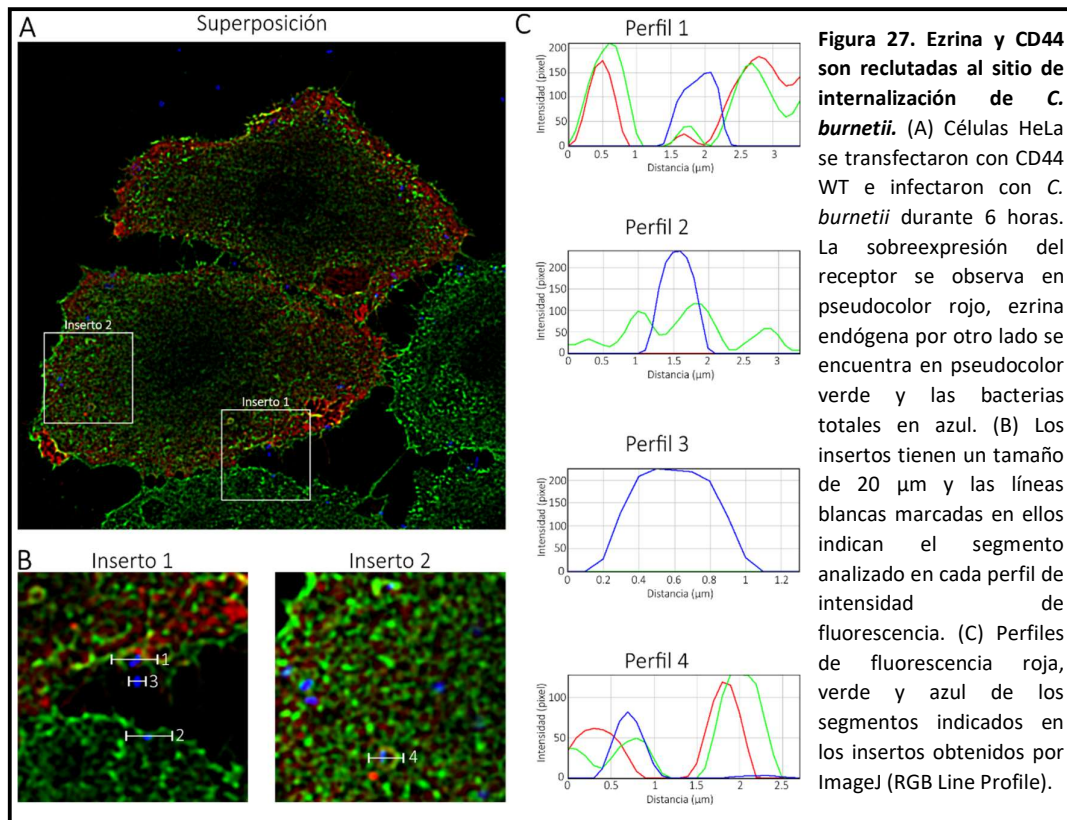
1218 En la figura 26.A (primera columna en pseudocolor rojo) se puede observar que todos los  
1219 constructos presentan una distribución a nivel de membrana plasmática y, en algunos casos, en  
1220 finas proyecciones similares a filopodios. Interesantemente, la forma WT de CD44 también se  
1221 observó, ocasionalmente, en pequeñas vacuolas algunas de las cuales contenían *C. burnetii* en su  
1222 interior (señaladas con punta de flecha amarilla en la figura 26.A). La sobreexpresión de CD44<sup>WT</sup>  
1223 no tuvo efectos en los porcentajes de internalización de *C. burnetii*. Por otro lado, las mutantes  
1224 CD44<sup>ΔE</sup> y CD44<sup>KR</sup> produjeron una disminución del número de bacterias internalizadas, efecto que  
1225 fue mayor en el caso de la forma CD44<sup>ΔCD</sup> (figura 26.B). Sorprendentemente la sobreexpresión de  
1226 los distintos constructos no influyó en la adhesión de *C. burnetii* a la célula hospedadora (figura  
1227 26.C). Como se puede observar en la gráfica 26.B la sobreexpresión de la mutante KR de CD44  
1228 genera una disminución del 50% en el número de bacterias internalizadas comparado con células  
1229 control.

**Figura 26. Efecto de la sobreexpresión de la forma salvaje del receptor CD44 y mutantes en la internalización de *C. burnetii*.** (A) Células HeLa se transfectaron con mCherry (vector vacío), CD44<sup>WT</sup>, una mutante del receptor incapaz de interaccionar con ezrina (CD44<sup>KR</sup>), una forma truncada que solo presenta el segmento intracelular (CD44<sup>ΔE</sup>) y una que carece de dicho fragmento (CD44<sup>ΔCD</sup>). Los distintos constructos de CD44 se identificaron con anticuerpos específicos contra su marcador c-myc o FLAG (pseudocolor rojo). Las bacterias adheridas se pueden identificar por su doble pseudocolor verde y blanco. Por otro lado, las bacterias internalizadas solo presentan una marca (pseudocolor verde). Las barras y los insertos tienen un tamaño de 10 μm. Las células transfectadas se delimitaron con línea sólida y las que no adquirieron el constructo con trazo intermitente. Las flechas en el inserto indican bacterias adheridas y las puntas de flechas internalizadas. Las puntas de flechas amarillas indican vacuolas de *C. burnetii* con CD44. (B) Cuantificación y análisis estadístico del porcentaje de *C. burnetii* internalizadas y (C) bacterias totales por célula. Se muestran los valores promedio ±SEM obtenidos a partir de tres ensayos independientes, contando 30 células por ensayo. ns = no significativo; \*\*\* p < 0.001.



Debido a que la mutante KR de CD44 solo tiene afectado su sitio de interacción con ezrina es que decidimos estudiar la relación entre ambas proteínas. Para ello células HeLa fueron transfectadas con la forma WT de CD44 e infectadas durante 6 horas. Las células se fijaron, se procesaron para IFI para determinar las bacterias totales empleando anticuerpos contra *C. burnetii* (pseudocolor azul), CD44 con un anticuerpo específico contra c-myc (pseudocolor rojo) y ezrina endógena (pseudocolor verde). Las células se analizaron por microscopía de fluorescencia confocal. En la figura 27.A se puede observar en la superposición una importante colocalización de ambas proteínas principalmente a nivel de la membrana plasmática y en estructuras similares a filopodios. Al analizar el perfil de intensidad de fluorescencia lineal 1 se puede ver la presencia

de CD44 y ezrina alrededor de *C. burnetii*. El reclutamiento de ezrina no sería efecto de la sobreexpresión del receptor ya que en el caso del perfil 2 (presente en una célula no transfectada) se detecta intensidad de fluorescencia verde junto al pseudocolor azul de la bacteria. El tercer perfil fue analizado como control negativo porque no se encuentra adherida a la célula por lo que solo muestra la fluorescencia azul. Finalmente, en algunos casos se observó bacterias en pequeñas vesículas rodeadas por CD44 (concordando con lo observado en la figura 26.A) y ezrina endógena (perfil 4).



## 1246 III.2 Resultados del segundo objetivo específico

1247 **Estudiar la participación de las proteínas ERM y proteínas asociadas en la formación**  
1248 **de la vacuola parasitófora donde reside *Coxiella burnetii*.**

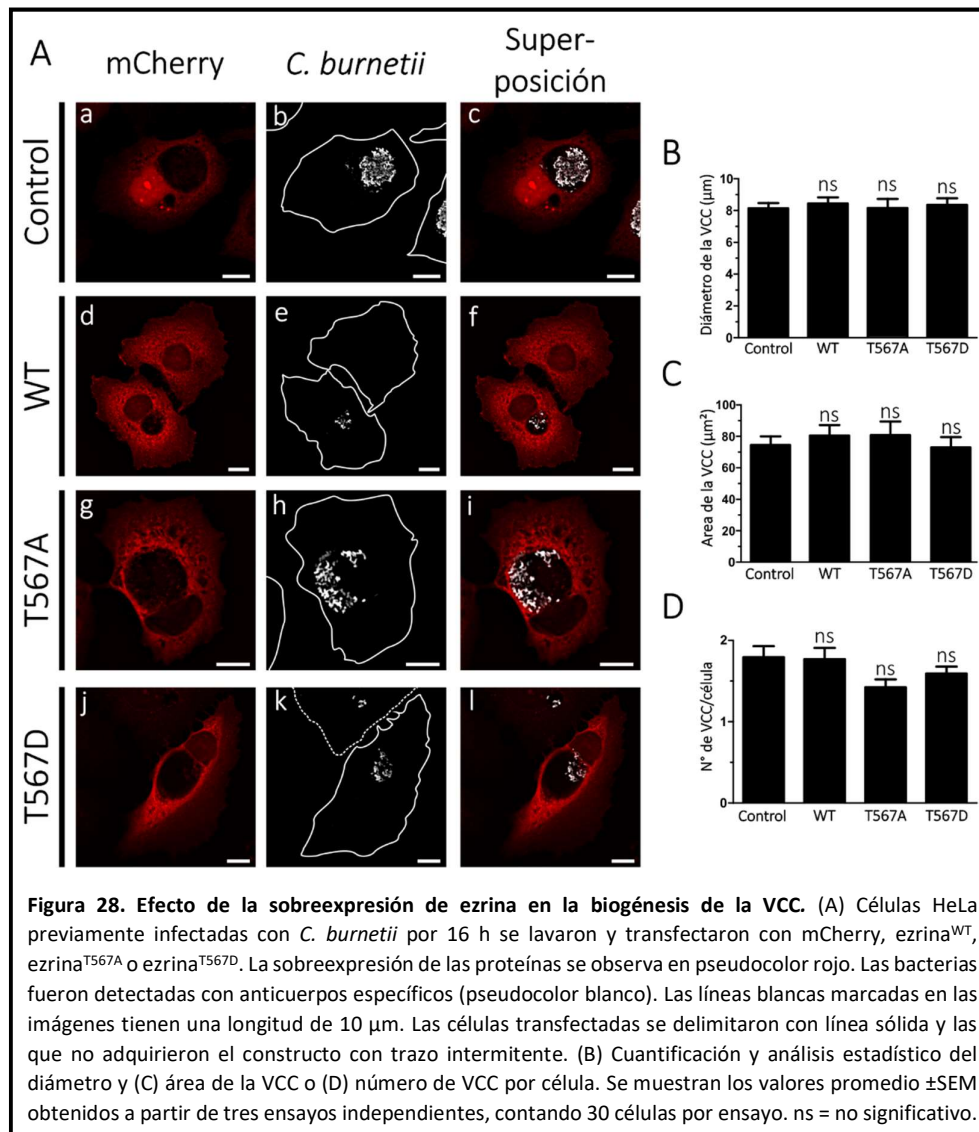
### 1249 III.2.1 Ezrina no participa en la biogénesis de la vacuola que 1250 contiene a *Coxiella burnetii*

1251 El rol del citoesqueleto de actina, como se menciona previamente, en etapas iniciales de  
1252 la fagocitosis ha sido descrito ampliamente. Sin embargo, la función de los filamentos de actina  
1253 en el desarrollo de fagosomas aún permanece poco estudiada. Se ha observado que fagosomas  
1254 que contenían perlas de látex eran capaces de promover la polimerización de actina *in vitro*  
1255 (Defacque y col. 2000). Además, el análisis proteómico de fagosomas purificados identificó la  
1256 presencia en su membrana de actina y diferentes proteínas de unión a actina (Griffiths y Mayorga  
1257 2007). En relación a ello, Marion y colaboradores (2011) demostraron que ezrina se encuentra  
1258 presente en la membrana de fagosomas y regula el anclaje de microfilamentos. Por otro lado, se  
1259 ha determinado que *Listeria monocytogenes* y diferentes partículas de gran tamaño, una vez  
1260 internalizadas, inducen el ensamble y desensamble de filamentos de actina en la membrana del  
1261 fagosoma. Este proceso es sumamente rápido (segundos) y ha sido denominado “flashing” (Yam  
1262 y Theriot 2004). Se postula que la presencia de filamentos de actina en la membrana de fagosomas  
1263 de distintas naturalezas permitiría su movimiento en el citoplasma. El ensamblaje asimétrico de  
1264 microfilamentos en la cara citoplasmática de la membrana del fagosoma sería capaz de producir  
1265 el impulso de la vesícula (Clarke y col. 2006; Zhang y col. 2002). La relación del citoesqueleto de  
1266 actina con la Vacuola que Contiene a *C. burnetii* (VCC) aún se encuentra poco descripta. Trabajos  
1267 previos de nuestro laboratorio han demostrado que actina y GTPasa de la familia Rho se reclutan  
1268 a la membrana de la VCC y son necesarias para la biogénesis de la VCC (Aguilera y col. 2009).

1269 Para estudiar el rol de ezrina en la formación de la VCC, células HeLa fueron infectadas  
1270 durante 16 horas y luego lavadas para eliminar aquellas bacterias que no hayan sido internalizadas  
1271 (tiempo 0h post-infección). Posteriormente se transfectaron con ezrina<sup>WT</sup>, su mutante no  
1272 fosforilable (ezrina<sup>T567A</sup>) y su forma pseudofosforilada (ezrina<sup>T567D</sup>). Luego de 24 o 48 horas post-  
1273 infección, las células se fijaron y procesaron para IFI para determinar las bacterias empleando  
1274 anticuerpos contra *C. burnetii* (pseudocolor blanco). Las células se analizaron por microscopía de  
1275 epifluorescencia. A partir de las imágenes obtenidas se cuantificó el número y tamaño de VCC por



1276 célula. Como se puede observar en la figura 28.A (pseudocolor rojo) la forma WT de ezrina al igual  
 1277 que sus mutantes se distribuyen principalmente a nivel del citoplasma, de forma similar a lo  
 1278 observado previamente (figura 22). Además, ninguno de los constructos sobreexpresados se  
 1279 reclutó a la membrana de la Vacuola que contiene a *C. burnetii* (figura 28.A en la tercera columna  
 1280 en pseudolor rojo). Se determinó que la sobreexpresión de los distintos constructos de ezrina no  
 1281 produjo variaciones en su tamaño (Figura 28 B y C). En todos los casos se pueden observar VCC  
 1282 con un diámetro cercano a 8  $\mu\text{m}$  y un área de 70 a 80  $\mu\text{m}^2$ . El número de VCC presente también  
 1283 se mantuvo constante encontrando entre una o dos vacuolas de gran tamaño por célula (gráfico  
 1284 28.D). Estos resultados indicarían que ezrina no interviene en la biogénesis de la VCC.





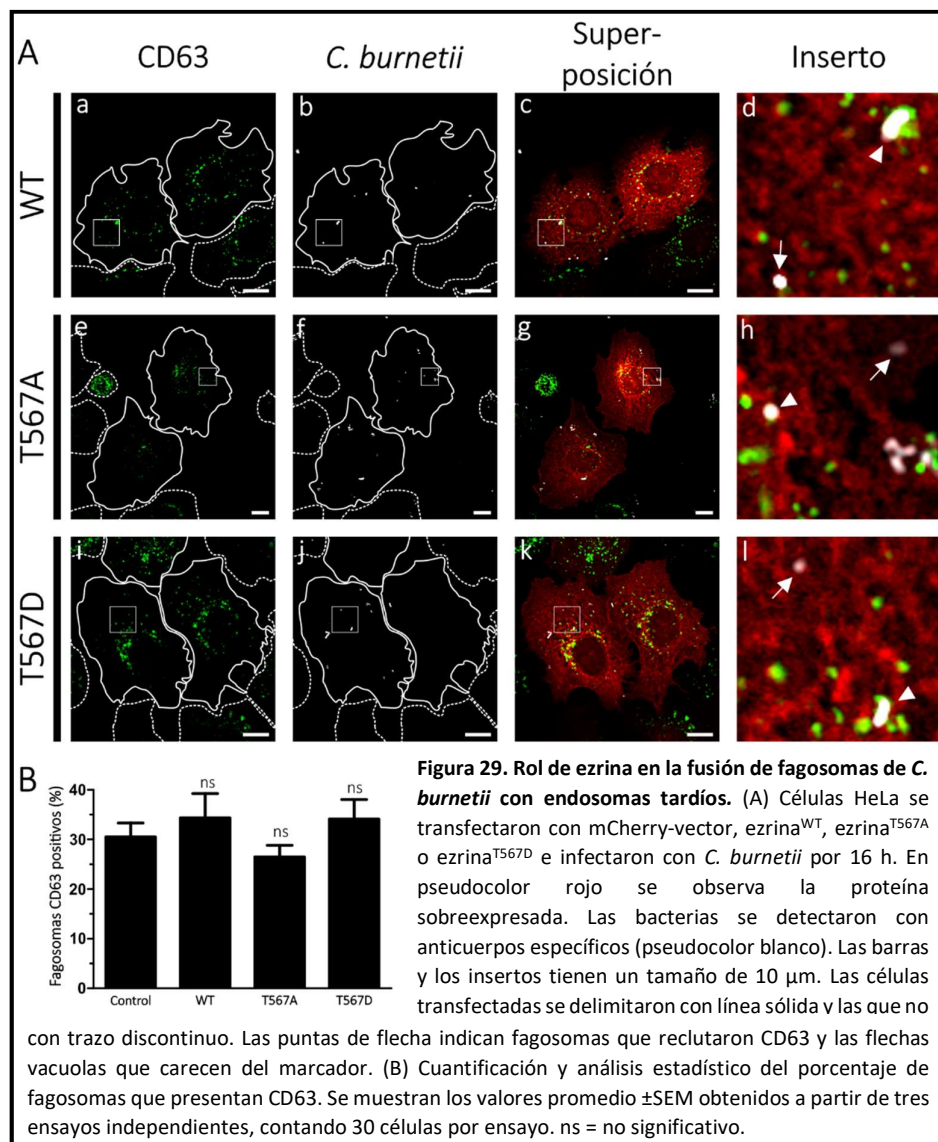
### 1285 III.2.2 La sobreexpresión de ezrina no afecta la interacción de la 1286 vacuola que contiene a *Coxiella burnetii* con endosomas tardíos

1287 La morfología de la VCC (tamaño y número) no se modificó al sobre sobreexpresar  
1288 ezrina<sup>WT</sup>, ezrina<sup>T567A</sup> o ezrina<sup>T567D</sup> (figura 28). A pesar de ello nos preguntamos si ezrina podría  
1289 intervenir el desarrollo de la maduración de la VCC. Estudios realizados en líneas celulares de  
1290 macrófagos J774A.1 mostraron que ezrina está presente principalmente en la membrana  
1291 plasmática pero también se encuentra enriquecida en fagosomas de perlas de látex, endosomas  
1292 tempranos y tardíos (Defacque y col. 2000). Además, Kjeiken y colaboradores (2004) demostraron  
1293 que tanto actina como ezrina son proteínas importantes para que se produzca la fusión de  
1294 fagosomas con endosomas tardíos. En su trabajo proponen que la polimerización de actina  
1295 producida en fagosomas actuaría como andamiaje para el acercamiento de endosomas tardíos y  
1296 la posterior fusión. Además, se ha visto que las proteínas ERM regulan la maduración de  
1297 endosomas permitiendo el intercambio de GTPasas Rab5 (marcador de endosoma temprano) por  
1298 Rab7 a través del complejo HOPS (“homotypic fusion and vacuole protein sorting”) (Chirivino y  
1299 col. 2011).

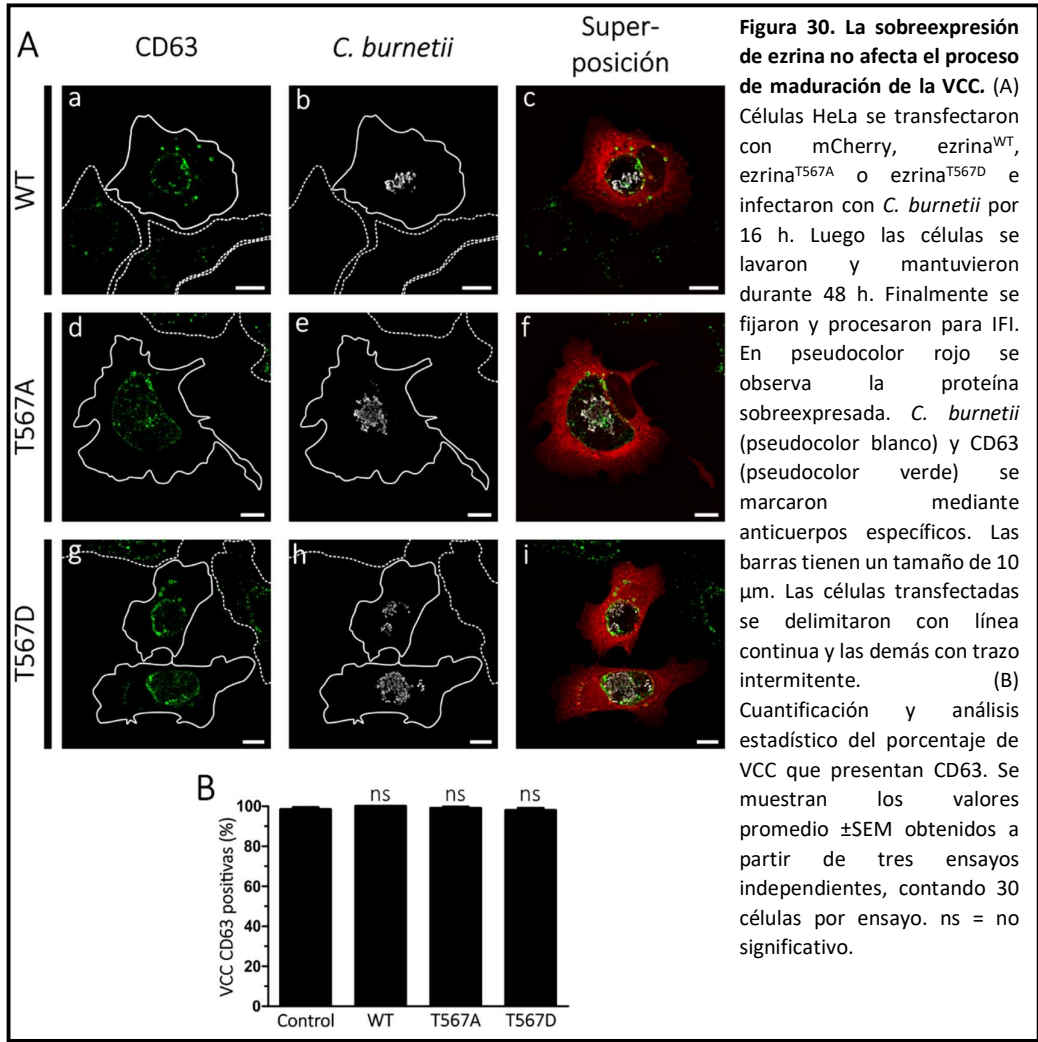
1300 CD63 es una proteína de membrana perteneciente a la superfamilia de las tetraspaninas  
1301 (Pols y Klumperman 2009). Su distribución en compartimentos membranosos celulares es muy  
1302 compleja, pero se encontrar muy enriquecida en endosomas tardíos (Pols y Klumperman 2009;  
1303 Beatty 2006). Otro marcador típico de este tipo de compartimientos es la GTPasa Rab7. Trabajos  
1304 previos han demostrado que ambas moléculas son reclutadas a un alto porcentaje de VCCs tanto  
1305 en monocitos y macrófagos como en células no fagocíticas (Ghigo y col. 2002; Romano y col. 2007;  
1306 Berón y col. 2002). Además, en el caso de CD63 suele ser empleado como un marcador típico de  
1307 la vacuola formada por *C. burnetii* (Colonne y col. 2016).

1308 Para analizar la relación entre ezrina, la VCC y endosomas tardíos, células HeLa fueron  
1309 transfectadas con ezrina<sup>WT</sup>, ezrina<sup>T567A</sup> o ezrina<sup>T567D</sup> por 3 horas e infectadas con suspensiones de  
1310 *C. burnetii*. Luego de 16 horas las células fueron lavadas para eliminar las bacterias no  
1311 internalizadas. Un grupo de células fue fijado y procesado por IFI (tiempo 0h post-infección)  
1312 mientras que el resto siguió el curso de la infección por 24 o 48 h. Se detectó CD63 y *C. burnetii*  
1313 empleando los correspondientes anticuerpos específicos. El análisis de las células fue realizado  
1314 mediante microscopía confocal y epifluorescencia. A partir de las imágenes obtenidas se  
1315 cuantificó el porcentaje de VCC que presentaban el marcador CD63.

1316 Como se puede observar en la imagen 29A a 0h post-infección, *C. burnetii* se encuentra  
 1317 en pequeños fagosomas (pseudocolor blanco), algunos de los cuales presentan ezrina a su  
 1318 alrededor (pseudocolor rojo). Por otro lado, CD63 se distribuye en un gran número de vesículas  
 1319 de tamaño variable, enriquecidas en la región perinuclear de la célula (pseudocolor verde). Esto  
 1320 último se ve acentuado por la sobreexpresión de las formas T567A y T567D. El reclutamiento de  
 1321 CD63 en fagosomas fue mayor en aquellas células que sobreexpresaban ezrina WT o la mutante  
 1322 fosfomimética, y disminuyó en el caso de la forma no fosforilable comparado con el control  
 1323 (vector-mCherry). Sin embargo, estas pequeñas variaciones no fueron significativas  
 1324 estadísticamente (figura 29.B).



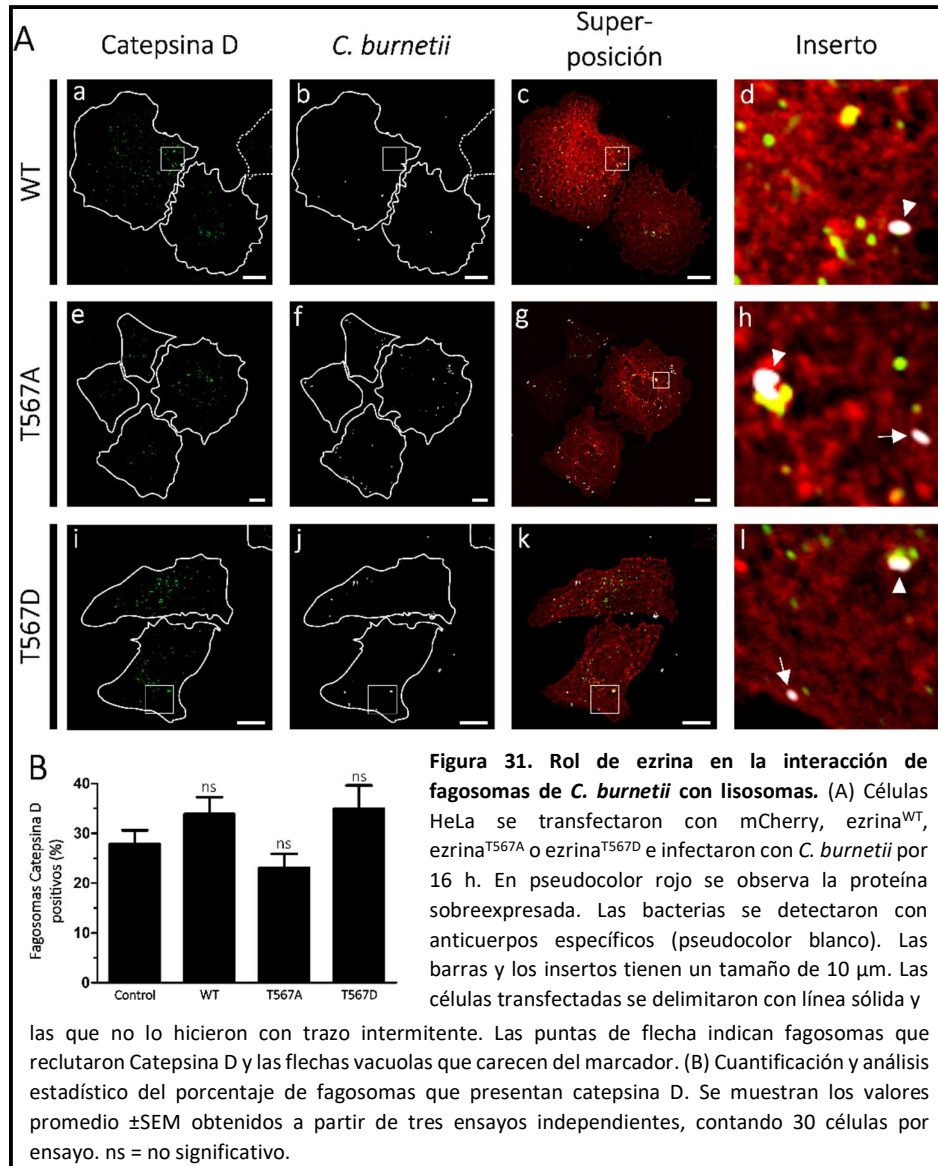
Una vez formada la VCC (48 h post-infección) CD63 se encontró presente de forma casi exclusiva en la VCC. Sin embargo, en aquellas células que sobreexpresan ezrina WT o su mutante fosfomimética se observan vesículas de un tamaño intermedio marcadas con CD63, pero sin *C. burnetii* (figura 30.A, paneles f-i). El análisis cuantitativo mostró que CD63 se recluta a casi el total de las VCCs (figura 30.B). Valores similares se observaron al analizar Rab7 (datos no mostrados). En conjunto los resultados obtenidos indican que ezrina no interviene en la interacción de endosomas tardíos con la VCC durante su maduración.



### III.2.3 Ezrina no interviene en la fusión de lisosomas con la Vacuola que contiene a *Coxiella burnetii*

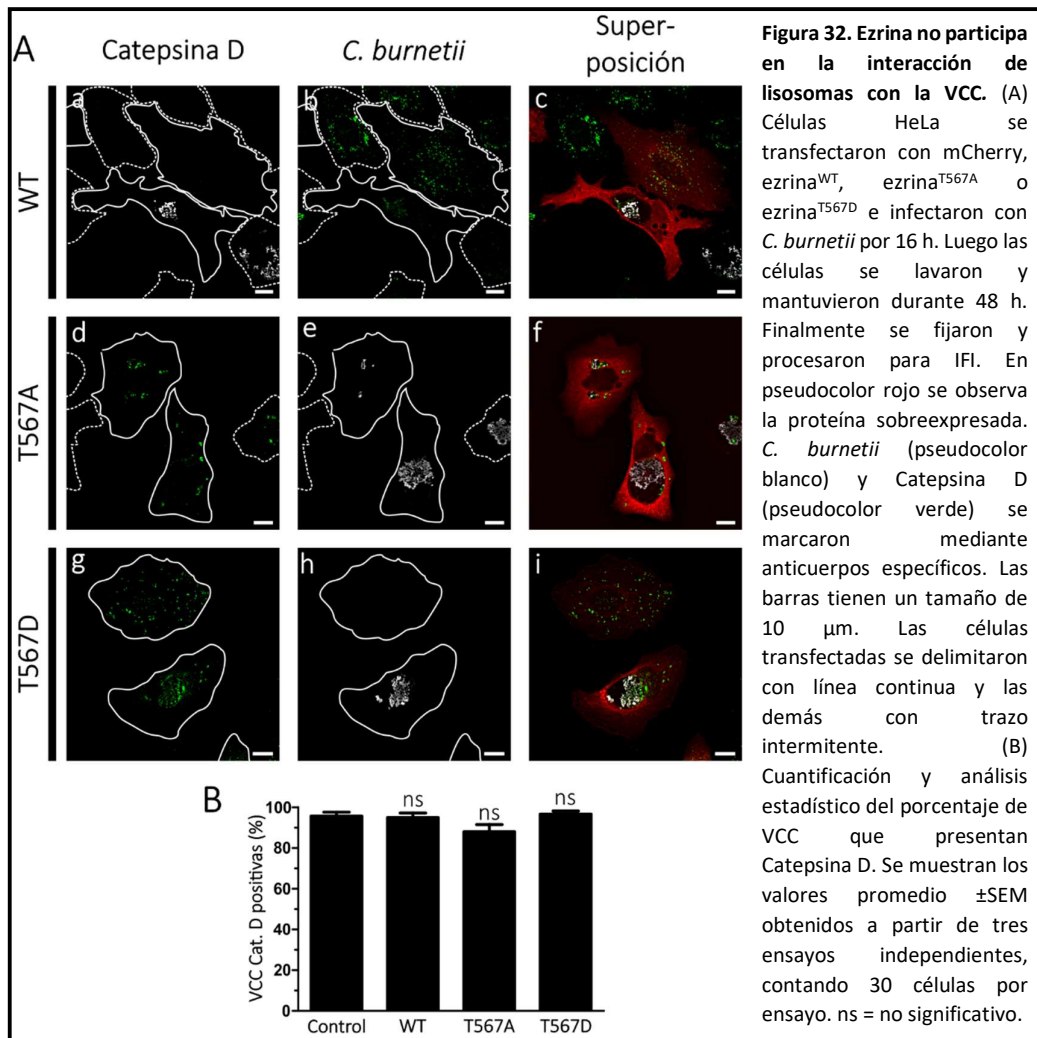
El proceso de maduración de la VCC involucra la fusión con lisosomas, caracterizada por la presencia de proteínas LAMP y enzimas lisosomales como catepsina D (como se menciona en la primera sección). El mecanismo por el cual la VCC interacciona con lisosomas aún presenta

1337 ciertas controversias. Algunos estudios indican que la bacteria es capaz de modular el tráfico  
1338 endolisosomal, a través de efectores liberados por su sistema de secreción tipo IV, para formar la  
1339 característica VCC (Larson y col. 2015; Larson y col. 2013). Por otro lado, se ha observado que  
1340 marcadores lisosomales como LAMP1 son adquiridos de manera independiente a la síntesis  
1341 proteica de la bacteria (Howe y col. 2003). La relación de ezrina con estos compartimentos esta  
1342 poco estudiada. Se ha demostrado que ezrina es capaz de regular la fusión de fagosomas con  
1343 lisosomas (Marion y col. 2011).



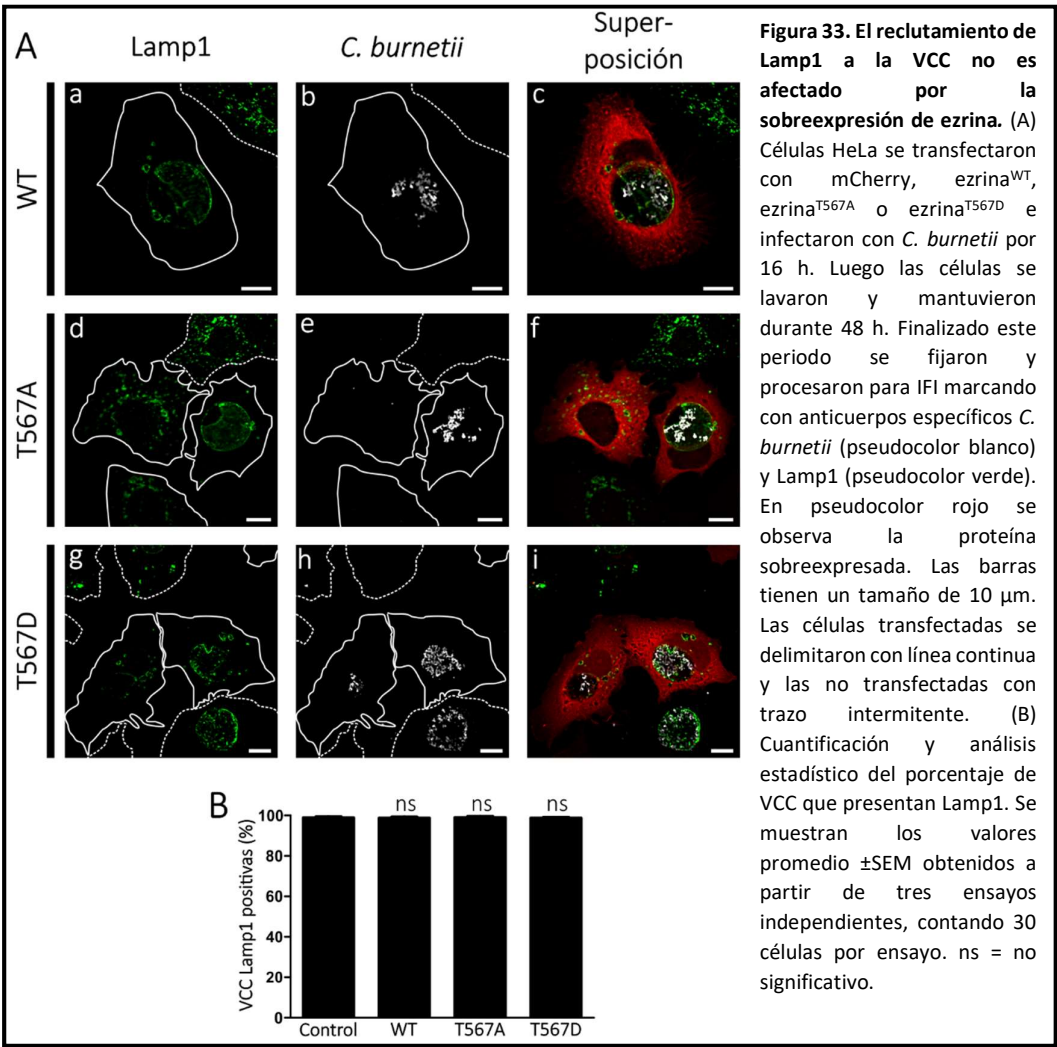
1344 Para estudiar el rol de ezrina en la interacción de lisosomas con la VCC durante su proceso  
1345 de maduración se procedió como se explicó previamente en el análisis de CD63, pero en este caso  
1346 se detectó catepsina D mediante anticuerpos específicos. A tiempos tempranos en la formación

de la VCC (0 h post-infección) se observa una distribución homogénea de los lisosomas en el citoplasma celular (pseudocolor verde). Al igual que con endosomas tardíos, se pueden detectar un número importantes de lisosomas que colocan con ezrina WT o sus mutantes (pseudocolor rojo) (figura 31.A paneles c-k). Sin embargo, el porcentaje de fagocitos en formación de *C. burnetii* que presentaban catepsina D en su interior (punta de flecha en el inserto de la figura 31.A) no se vio afectado por la sobreexpresión de los diferentes constructos de ezrina (figura 31.B).



El análisis del efecto de la sobreexpresión de ezrina sobre la relación de la VCC con lisosomas, a 48 h post-infección, se realizó empleando dos marcadores característicos: catepsina D y Lamp1. En ambos casos se vio un reclutamiento casi exclusivo del marcador en la VCC (figuras 32.A y 33.A). Como se observa en las gráficas 32.B y 33.B el reclutamiento de ambas moléculas a la VCC no se modificó en ningún caso llegando a porcentajes cercanos al 100%. Estos resultados

1358 demuestran que ezrina no intervendría en la fusión de la VCC con lisosomas durante el transcurso  
1359 de su maduración.





## IV.DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### IV.1. Discusión

*C. burnetii* es un patógeno intracelular obligado que presenta tropismo por monocitos y macrófagos alveolares (Fernandes y col. 2016), sin embargo se ha demostrado que distintos tipos de células epiteliales son permisivos a la bacteria (Sobotta y col. 2017). En relación con esto, se postula que los tejidos epiteliales podrían formar un sitio secundario de infección y ser utilizados como nicho por la bacteria para evitar activar el sistema inmune del hospedador (Sobotta y col. 2017). En este trabajo, las infecciones se realizaron con la cepa avirulenta de *C. burnetii* denominada variante Nine Mile fase II (NMII) que se diferencia de la forma virulenta variante Nine Mile fase I (NMI) por su LPS truncado (Lukáčová y col. 1993; Hoover y col. 2002; Millar y col. 2017). Estudios iniciales indican que *C. burnetii* fase II es internalizada de forma más eficiente que su variante virulenta en monocitos humanos (Capo y col. 1999). Sin embargo, Shannon y Heinzen (2008) demostraron que ambas cepas infectan y se replican en macrófagos derivados de monocitos humanos con cinéticas similares. Además, un trabajo reciente estableció que las dos formas de la bacteria invaden con la misma eficiencia macrófagos alveolares (Sobotta y col. 2016).

Como se menciona previamente, el ingreso de *C. burnetii* es pasivo (Baca y col. 1993) por lo que no dependería de su sistema de secreción (Carey y col. 2011; Beare y col. 2011) pero si de la interacción entre proteínas de la membrana de la bacteria y de la célula hospedadora (van Schaik y col. 2013; Martinez y col. 2014; Salinas y col. 2015). Actualmente, los únicos receptores determinados en el proceso de internalización de *C. burnetii* NMII en monocitos son las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_M\beta_2$  (CR3) (Capo y col. 1999). Las células no fagocíticas carecen del receptor de complemento por lo que solo contarían con la integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Sin embargo, se especula que otros receptores celulares se encuentran involucrados en el ingreso de la bacteria. En este trabajo observamos que el silenciamiento del receptor CD44 reduce los porcentajes de internalización de *C. burnetii* en un 50% con respecto al control. Este efecto fue completamente revertido por la sobreexpresión de la forma resistente al silenciamiento de CD44. Interesantemente la adhesión de la bacteria no fue afectada por la disminución de la expresión del receptor. Sin lugar a dudas, este receptor está involucrado en el proceso de internalización de *C. burnetii*. Un trabajo reciente mostró que el silenciamiento de CD44 en macrófagos produce menores niveles de internalización de *Staphylococcus aureus* sin afectar su adherencia a la célula (Li y col. 2017). En el caso de *C. burnetii*, la asociación a la célula podría depender principalmente de la integrina  $\alpha_v\beta_3$ , razón por la

1391 cual la disminución de los niveles de expresión de CD44 no tiene efecto en la asociación de la  
1392 bacteria. Estudios realizados con moléculas compuestas por ácido hialurónico y péptidos RGD  
1393 (dominio principal de unión a integrinas presente en proteínas de la matriz extracelular)  
1394 mostraron que la unión inicial se establece con la integrina y posteriormente se genera el contacto  
1395 con CD44 (Ouasti y col. 2012). Dellacasagrande y colaboradores (2000) establecieron que el  
1396 tratamiento de monocitos con péptidos que inhiben a la integrina  $\alpha_v\beta_3$  o el bloqueo de dicho  
1397 receptor con anticuerpos específicos producen una disminución de la asociación de *C. burnetii* casi  
1398 total (85%). Por otro lado, Gilk y colaboradores (2013) observaron que el tratamiento con  
1399 vitronectina o anticuerpos contra la integrina  $\alpha_v\beta_3$  produce una disminución en la internalización  
1400 de *C. burnetii*. Sin embargo, el estudio no analiza la asociación de la bacteria a la célula por lo que  
1401 no puede descartarse que la menor cantidad de bacterias internalizada que observan se deba a  
1402 una adherencia disminuida de *C. burnetii* al receptor, más que a una inhibición de la  
1403 internalización.

1404 Los resultados obtenidos al sobreexpresar CD44 y sus mutantes se relacionan  
1405 íntimamente con lo observado al silenciar el receptor. El análisis de estos datos permite describir  
1406 y entender parte del rol de CD44 en la internalización de *C. burnetii*. En primer lugar, se determinó  
1407 que ninguno de los constructos produce variaciones en los niveles de asociación de la bacteria  
1408 coincidiendo con lo indicado previamente al silenciar el receptor. Por otro lado, la sobreexpresión  
1409 de la forma salvaje de CD44 no modificó los valores de internalización. Esto podría deberse a que  
1410 las células HeLa presentan altos niveles de CD44 endógeno y la sobreexpresión exógena tendría  
1411 un efecto redundante (Bruno y col. 2000; Picaud y col. 2014; Shen 2013; Figueroa y col. 2015).  
1412 Además, la actividad de CD44 estaría limitada por la interacción con otros receptores o moléculas  
1413 de señalización que no se encuentran sobreexpresados. Sin embargo, estas hipótesis aún deben  
1414 ser confirmadas con ensayos adicionales. En el caso de la mutante que carece de su segmento  
1415 extracelular, su efecto inhibitorio podría deberse a que compite con la forma endógena del  
1416 receptor por proteínas de señalización y anclaje de actina (Brown y col. 2005). Un estudio reciente  
1417 demostró que la sobreexpresión del dominio intracelular de CD44 produce un efecto competitivo  
1418 o dominante negativo sobre la forma endógena. Como resultado interfiere en el anclaje de actina  
1419 a CD44 e interrumpe su capacidad de asociación a proteínas de la matriz extracelular (Mellor y col.  
1420 2013). La mutante carente del dominio intracelular (CD44<sup>ΔICD</sup>) sería capaz de interaccionar con la  
1421 bacteria, pero no podría desencadenar la señalización correspondiente ni unirse al citoesqueleto



1422 de actina. Se ha observado que dicho dominio es importante para la interacción del receptor con  
1423 ácido hialurónico (Perschl y col. 1995) y su falta impide la endocitosis del receptor (Jiang y col.  
1424 2002). Además, estudios previos indican que tanto la fagocitosis mediada por CD44 como  
1425 receptor primario o bien como co-receptor del CR3 dependen de la señalización inducida por el  
1426 dominio intracelular (Vachon y col. 2007; Vachon y col. 2006). La mutante de CD44 incapaz de  
1427 interaccionar con las proteínas ERM (CD44<sup>KR</sup>) establece la importancia de esta relación durante la  
1428 internalización de *C. burnetii*. Estos resultados fueron reforzados por la colocalización de la forma  
1429 endógena de ezrina con CD44<sup>WT</sup> en el sitio de contacto de diversas bacterias con la célula  
1430 hospedadora. Legg y Isacke (1998) describieron el efecto de la mutación y su relevancia en la  
1431 transmisión de la señalización desde el exterior al interior celular. Como se menciona  
1432 previamente, esta interacción es necesaria para la internalización de patógenos como  
1433 *Staphylococcus aureus* (Li y col. 2017). Por otro lado, trabajos recientes demostraron la relevancia  
1434 de la unión de ezrina con CD44 en la formación de agrupaciones del receptor (Wang y col. 2014)  
1435 y complejos multiméricos con ezrina (Chen y col. 2015).

1436       Una vez asociada *C. burnetii* a la membrana de las células HeLa comenzará a desarrollarse  
1437 su internalización. Como se menciona previamente, estudios realizados en el laboratorio  
1438 establecen la importancia de las GTPasas Rho en el ingreso a la célula hospedadora (Salinas y col.  
1439 2015). En este trabajo de tesis se analizó RhoGDI $\alpha$ , uno de los reguladores principales de estas  
1440 pequeñas GTPasas. Los resultados mostraron que la sobreexpresión de la forma WT produce una  
1441 disminución del 45% de bacterias internalizadas. El exceso de RhoGDI $\alpha$  presente en la célula  
1442 podría inhibir la activación de RhoA y Rac1 producida por *C. burnetii* para inducir su internalización.  
1443 Con relación a esto se ha descrito que variaciones en los niveles de expresión de RhoGDIs afecta  
1444 de forma directa la actividad de las Rho GTPasas. Así, el silenciamiento produce como resultado  
1445 una actividad permanente de las GTPasas endógenas (Bozza y col. 2015) mientras que la  
1446 sobreexpresión de RhoGDI $\alpha$  aumenta su interacción con las principales GTPasas e incluso su  
1447 secuestro hacia el citosol (DerMardirossian y col. 2006; Boulter y col. 2010). Como se menciona  
1448 previamente, esta inhibición no podría ser generada por las mutantes RhoGDI $\alpha$ <sup>D45A</sup> y  
1449 RhoGDI $\alpha$ <sup>D185A</sup> ya que no pueden impedir la activación de las GTPasas a las cuales se asocian  
1450 (Dransart y col. 2005). Interesantemente, tanto RhoGDI $\alpha$  como su isoforma  $\beta$  pueden ser  
1451 inhibidas por su fosforilación mediada por Src (Wu y col. 2009; DerMardirossian y col. 2006). *C.*

1452 *burnetii* activa la vía de señalización de Src por lo que podría afectar la actividad de RhoGDIs  
1453 endógenas de esta manera (Rosales y col. 2012).

1454 Las GTPasas Rho, como se menciona previamente, regulan una extremada variedad de  
1455 vías de señalización a nivel celular. Para este trabajo se decidió centrar el análisis en RhoA/ROCK y  
1456 sus efectores principales: miosina no muscular tipo II (MNM II), las kinasas LIM (LIMK) y las  
1457 proteínas ERM. El tratamiento con blebistatina, inhibidor de MNM II, generó una disminución del  
1458 porcentaje de internalización cercana al 25% que se mantuvo al incrementar las concentraciones  
1459 de la droga. Esto coincide con varios estudios que aseveran una participación activa de MNM II en  
1460 la fagocitosis de partículas inertes como perlas de látex o bacterias muertas por calor (Gu y col.  
1461 2010) e internalización de virus o bacterias. En relación con esto último, se ha observado que el  
1462 virus del herpes simple tipo I (Arii y col. 2010), virus de la estomatitis vesicular (Lehmann y col.  
1463 2005), virus de la leucemia murina (Lehmann y col. 2005), virus del dengue (Zamudio-Meza y col.  
1464 2009), el virus sincitial respiratorio (Krzyszaniak y col. 2013) y bacterias como *Salmonella* (Hänisch  
1465 y col. 2011) emplean MNM II para su ingreso a la célula hospedadora. *Listeria monocytogenes*, por  
1466 el contrario, induce la fosforilación e inactivación de la cadena pesada de MNM II para lograr su  
1467 entrada a la célula (Almeida y col. 2015).

1468 Las kinasas LIM (LIMK) no han sido ampliamente estudiadas en relación con el proceso de  
1469 internalización de bacterias. Se ha demostrado que LIMK 1 cumple un rol activo en la entrada de  
1470 bacterias como *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes*. Un aspecto muy interesante  
1471 sobre el papel de LIMK es que es necesaria una regulación cíclica de ADF (“actin-depolymerizing  
1472 factor”) y cofilinas durante el ingreso de estas bacterias. En el caso de *S. typhimurium* se requiere  
1473 la actividad de LIMK 1 durante los primeros minutos de infección y posteriormente debe  
1474 reducirse. Por este motivo la sobreexpresión de una mutante negativa inhibe la internalización en  
1475 tiempos tempranos (15 minutos) pero luego (60 minutos) los valores se igualan a los de la mutante  
1476 positiva o la forma salvaje (Dai y col. 2004). *L. monocytogenes* necesita también una actividad  
1477 cíclica de LIMK 1 ya que la sobreexpresión de LIMK<sup>WT</sup>, una forma dominante negativa o una  
1478 constitutivamente activa produjeron la inhibición de la internalización de la bacteria (Bierne y col.  
1479 2001). Nuestros resultados indican que LIMK 2 no formaría parte de la internalización de *C.*  
1480 *burnetii* sin embargo no se puede descartar la posibilidad de que cumpla un rol cíclico en etapas  
1481 más tempranas del proceso. También se debe tener en cuenta que la entrada de *C. burnetii* puede  
1482 estar regulada por LIMK 1. Sin embargo, esta opción sería menos probable ya que la

1483 sobreexpresión de las mutantes de LIMK 2 tendrían un efecto dominante, sobre la forma  
1484 endógena de ambas kinasas, en el estado de fosforilación de sus sustratos comunes ADF y cofilinas  
1485 (Amano y col. 2001).

1486 Los protagonistas centrales de este trabajo son las proteínas ERM y en especial ezrina.  
1487 Actualmente aún se encuentra en discusión si los tres miembros principales de esta familia  
1488 cumplen un rol redundante o no en los diferentes tejidos en que actúan. Sin embargo, se postula  
1489 que la importancia de cada proteína depende del tipo celular específico en estudio (Arpin y col.  
1490 2011; Fehon y col. 2010; Ponuwei 2016). En tejidos epiteliales, ezrina es el miembro de las  
1491 proteínas ERM con mayor expresión (Bretscher y col. 1997; Fiévet y col. 2007). En nuestro modelo  
1492 observamos que el silenciamiento de ezrina produce una disminución del 50% en la  
1493 internalización de *C. burnetii*. La expresión de la forma truncada ezrina<sup>N-ter</sup> con efecto dominante  
1494 negativo, genera una inhibición semejante en los porcentajes de internalización. Estos resultados  
1495 coinciden con lo observado en estudios que emplean diversas bacterias y tipos de células  
1496 hospedadoras. Skoudy y colaboradores (1999) demostraron que la sobreexpresión de la mutante  
1497 truncada de ezrina (ezrina<sup>N-ter</sup>) reduce drásticamente el número de *Shigella flexneri* internalizada  
1498 en células HeLa. Años más tarde se determinó que la internalización de *Neisseria meningitidis* en  
1499 células endoteliales, dependía de la formación de estructuras similares a microvellosidades en las  
1500 que participaban ezrina, CD44 y las GTPasas RhoA y Cdc42 (Eugène y col. 2002; Doulet y col. 2006).  
1501 Watanabe y colaboradores (2009) demostraron que el silenciamiento de ezrina disminuía la  
1502 entrada de *Brucella abortus* a trofoblastos gigantes. Interesantemente este efecto se observó  
1503 tanto en la internalización de la bacteria viva como la muerta (Watanabe y col. 2009). Resultados  
1504 similares se determinaron al analizar la fagocitosis de *Pseudomonas aeruginosa* en macrófagos  
1505 deficientes en ezrina (Di Pietro y col. 2017).

1506 Una etapa sumamente importante en la participación de ezrina en la entrada de *C.*  
1507 *burnetii* es la fosforilación de su residuo treonina 567. Los resultados obtenidos muestran que la  
1508 forma fosfomimética es capaz de incrementar la internalización de la bacteria mientras que la  
1509 mutante no fosforilable produjo una disminución significativa. Resultados preliminares, obtenidos  
1510 en el transcurso de una pasantía corta en el laboratorio del Dr. Matteo Bonazzi, mostraron que  
1511 ezrina sería fosforilada durante la internalización de *C. burnetii* Tn1832 (mutante control). Los  
1512 niveles de fosforilación máximos del proceso se observaron a 60 minutos post-infección (datos no  
1513 mostrados). Interesantemente un estudio reciente estableció que *S. aureus* induce la fosforilación

1514 del residuo 567 de ezrina durante su fagocitosis a través del receptor CD44, en estudios realizados  
1515 en macrófagos (Li y col. 2017). Se debe tener en cuenta que ezrina<sup>T567D</sup> podría beneficiar el ingreso  
1516 de *C. burnetii* al activar las GTPasas Rho a través de su unión e inactivación de RhoGDIs (Takahashi  
1517 y col. 1997).

1518 La sobreexpresión de la forma WT de ezrina no modificó los niveles de *C. burnetii*  
1519 internalizada. La transfección de la forma WT de diferentes proteínas empleadas en este trabajo  
1520 y en otros estudios realizados en el laboratorio tampoco afectó el ingreso de la bacteria a la célula  
1521 hospedadora (Rosales y col. 2012; Salinas y col. 2015). Esto indicaría que el mero aumento de los  
1522 niveles de la proteína no sería suficiente para promover el ingreso de la bacteria. Esta  
1523 particularidad puede deberse a que la mayoría de estas proteínas necesitan un estímulo, por  
1524 ejemplo, fosforilaciones, que produzca su activación para poder llevar a cabo su efecto. Además,  
1525 la entrada de *C. burnetii* NMII a la célula se desarrolla de forma discreta y produce una modesta  
1526 reorganización del citoesqueleto. Por este motivo es probable que la internalización de la bacteria  
1527 no requiera altos niveles de las proteínas implicadas sino una correcta activación. En ninguno de  
1528 los ensayos realizados para analizar el efecto de ezrina en la internalización de *C. burnetii* se  
1529 observaron variaciones en los niveles adherencia. Este resultado tiene sentido debido a que ezrina  
1530 no mantendría un contacto directo con la bacteria y su actividad se desencadenaría como  
1531 respuesta al contacto previo de *C. burnetii* con la célula hospedadora.

1532 La fosforilación del residuo 567 de ezrina puede ser producida por diversas kinasas. Como  
1533 se podrá observar en las perspectivas el análisis de estas kinasas durante el proceso de  
1534 internalización de *C. burnetii* es uno de los objetivos futuros. En este caso estudiamos de forma  
1535 específica la relación entre ezrina y ROCK a través de su inhibidor específico Y-27632. Este  
1536 compuesto es capaz de bloquear la actividad de ROCK I y II al unirse a su sitio catalítico e impedir  
1537 su actividad (Ishizaki y col. 2000). Al analizar el efecto de la sobreexpresión de ezrina<sup>T567D</sup> sobre la  
1538 internalización de *C. burnetii* en células tratadas con Y-27632 podemos inferir la importancia de  
1539 ezrina como efector de ROCK. La mutante fosfomimética ezrina<sup>T567D</sup> generó porcentajes de  
1540 bacterias internalizadas muy similares a los obtenidos en células controles no tratadas con la  
1541 droga. Esto demuestra que ezrina podría ser uno de los efectores principales activados por ROCK  
1542 durante el ingreso de *C. burnetii*. La inhibición producida por Y-27632 puede no haber sido  
1543 revertida por completo debido a que otras moléculas pertenecientes a la vía de señalización de  
1544 ROCK como MNM II se encontrarían también inhibidas afectando la internalización de la bacteria.

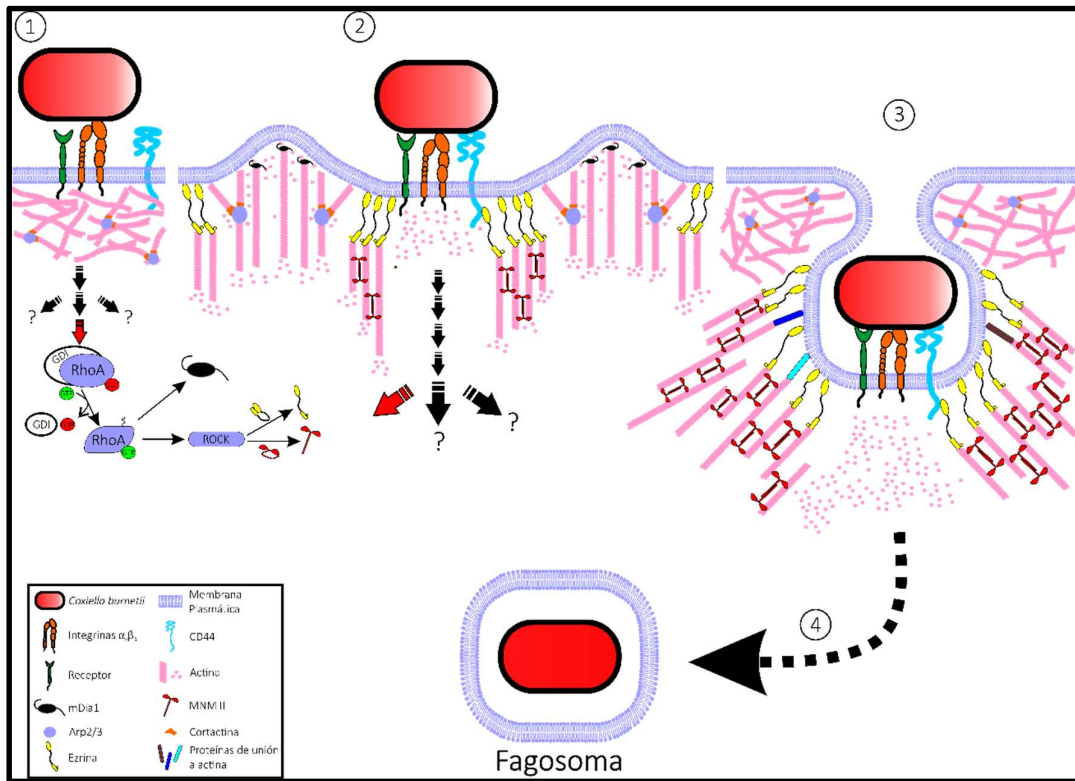
1545 Las proteínas OmpA se encuentran en la membrana externa de distintas bacterias y  
1546 tienen un rol clave en la adhesión, internalización, sobrevivencia intracelular y/o evasión del sistema  
1547 inmune del hospedador (Confer y Ayalew 2013). En *C. burnetii* la proteína actúa como una  
1548 invasina y es determinante para la internalización y replicación intracelular (sin afectar la  
1549 adherencia a la célula hospedadora). Un aspecto muy interesante de OmpA es que su efecto sobre  
1550 la internalización de la bacteria solamente se observa en células no fagocíticas. Se postuló que esto  
1551 podría deberse a que OmpA es clave para inducir la internalización de la bacteria en células que  
1552 no desarrollen un proceso de fagocitosis activo. Además, a través de experimentos enfocados a  
1553 estudiar el bloqueo de potenciales receptores celulares de OmpA, se observó la inhibición de su  
1554 internalización. Por este motivo se estipula que el ingreso a la célula hospedadora inducido por  
1555 OmpA dependería de un receptor celular aún no descrito (Martinez y col. 2014). El efecto de la  
1556 sobreexpresión de ezrina<sup>WT</sup>, ezrina<sup>T567A</sup> y ezrina<sup>T567D</sup> en el proceso de internalización de la mutante  
1557 Tn1832 (cepa control) fue similar a lo observado con la cepa salvaje de *C. burnetii*. Si bien los  
1558 valores de internalización y adhesión de la mutante Tn1832 difieren de lo observado con la cepa  
1559 salvaje de *C. burnetii*, la tendencia en la internalización se mantuvo. Por este motivo consideramos  
1560 que estas diferencias no modifican nuestras conclusiones sobre el rol de ezrina en el proceso de  
1561 internalización de *C. burnetii*. Es importante destacar que los ensayos con las mutantes de *C*  
1562 *burnetii* (Tn1832 y Tn208) se realizaron en el Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier  
1563 (IRIM-CNRS), Francia. Las diferencias en la internalización y adhesión de las bacterias podrían  
1564 relacionarse a pequeñas variaciones en la diferente metodología de propagación. Las mutantes  
1565 de *C. burnetii* Tn1832 y Tn208 fueron propagadas en medio de cultivo axénico mientras que la  
1566 cepa salvaje de la bacteria se propaga a través de pasajes en células Vero en cultivo (descrito en  
1567 la metodología). Otro factor podría ser los medios de cultivos utilizados (en particular el suero  
1568 fetal) y la célula hospedadora (diferente pasaje y mantenimiento). Los datos obtenidos al analizar  
1569 la internalización de la mutante Tn208 (carente de la invasina OmpA) fueron sumamente  
1570 interesantes. La mutante pseudofosforilada de ezrina logró triplicar los niveles de internalización  
1571 observados en células control mientras que la forma no fosforilable no generó cambio en dicho  
1572 porcentaje. En base a esto postulamos que ezrina podría formar parte de la vía de señalización  
1573 inducida por el contacto de OmpA con su receptor diana en la célula hospedadora. De esta  
1574 manera la mutante Tn208 no sería capaz de inducir esta señalización, pero al sobreexpresar la  
1575 forma fosfomimética de ezrina dicha vía se encontraría activa, al menos en parte, favoreciendo el

1576 ingreso de *C. burnetii*. Por otro lado, la mutante no fosforilable no generaría una mayor inhibición  
1577 ya que la vía de señalización se encontraría bloqueada desde sus inicios.

1578 El citoesqueleto de actina cumple un rol importante en el desarrollo de la vacuola de  
1579 diversos patógenos intracelulares. Bacterias como *Chlamydia trachomatis* emplean la GTPasa  
1580 RhoA para promover la polimerización de actina en la vecindad de su inclusión y así mantener la  
1581 integridad de dicho compartimiento (Méresse y col. 2001). *Salmonella typhimurium* induce  
1582 polimerizaciones de actina asociadas a la vacuola (VAP) en las cercanías de la vacuola que contiene  
1583 a *Salmonella* (SCV) (Méresse y col. 2001). En este caso a través de efectores bacterianos como  
1584 SspH2 interacciona y regula proteínas asociadas a actina como filamina y profilina (Miao y col.  
1585 2003). Otras proteínas efectoras como SopB actúan sobre diferentes GTPasas para modular la  
1586 maduración de la SCV (Hernandez y col. 2004) y en especial la vía de RhoA/ROCK/miosina II para  
1587 posicionar a la SCV en la región perinuclear (Wasylanka y col. 2008). Con relación a *C. burnetii*,  
1588 estudios previos de nuestro laboratorio determinaron la presencia de actina en la membrana de  
1589 la VCC. Además, se demostró que el tratamiento de células infectadas con agentes  
1590 despolimerizantes de actina produce la disminución del tamaño de la VCC. Se observó que las  
1591 GTPasas Rho y, en particular, RhoA cumplen un rol activo en la biogénesis de la VCC (Aguilera y  
1592 col. 2009). Diversos estudios han determinado la presencia de las proteínas ERM en la membrana  
1593 de fagosomas demostrando la importancia de estas proteínas en el tráfico y maduración de dichos  
1594 vesículas (Marion y col. 2011; Erwig y col. 2006; Chirivino y col. 2011). En este trabajo, observamos  
1595 que la sobreexpresión de ezrina como sus mutantes (ezrina<sup>T567A</sup> y ezrina<sup>T567D</sup>) no alteraron la  
1596 biogénesis de VCCs ya que estas vacuolas presentaron tamaños similares a los observados en el  
1597 correspondiente control (vector mCherry vacío). De igual manera, ezrina no modificó el  
1598 reclutamiento de diferentes marcadores de endosomas tardío y lisosomas como LAMP1,  
1599 catepsina D y CD63 a 48 horas post-infección. En el caso de catepsina D y CD63 tampoco se  
1600 observaron cambios en su reclutamiento a la VCC en tiempos tempranos (0 horas post-infección).  
1601 Los resultados obtenidos indican que ezrina no formaría parte del proceso de maduración ni  
1602 formación de la VCC. No se puede descartar que se encuentre implicada en la maduración del  
1603 fagosoma que contienen *C. burnetii* recién formado (etapa inmediatamente posterior a la  
1604 internalización). Sin embargo, este estudio sería complejo ya que ezrina, como se demuestra  
1605 previamente, produce un efecto importante sobre la internalización de *C. burnetii*.

1606 El trabajo presentado en este manuscrito de tesis permite comprender mejor la  
1607 maquinaria molecular asociada al citoesqueleto de actina implicada en la infección de *C. burnetii*.  
1608 La internalización de la bacteria, a pesar de desarrollarse de forma pasiva, requiere de la  
1609 interacción entre receptores celulares y proteínas de la membrana de *C. burnetii*. Además, luego  
1610 de este primer contacto, comienzan a participar del proceso una amplia variedad de moléculas  
1611 presentes en la célula. Tanto el contacto de la bacteria con la célula hospedadora como las vías de  
1612 señalización desencadenadas en consecuencia serían críticos para la internalización de *C. burnetii*  
1613 y el posterior destino de la VCC. En este trabajo se demostró que CD44 sería un nuevo receptor  
1614 implicado, junto a integrinas  $\alpha_v\beta_3$ , en la internalización de *C. burnetii*. Por otro lado, CD44 no  
1615 intervendría en la adherencia de la bacteria a la célula hospedadora. El receptor interaccionaría  
1616 con ezrina durante dicho proceso y esto sería crítico para el correcto ingreso de *C. burnetii* a la  
1617 célula hospedadora. El rol de ezrina sería clave en las primeras etapas de la infección, pero no  
1618 formaría parte de la biogénesis de la VCC. Además, ezrina necesitaría ser fosforilada en su residuo  
1619 treonina 567 para favorecer la internalización de la bacteria. En base a los ensayos realizados con  
1620 las mutantes de *C. burnetii* Tn1832 y Tn208, proponemos que ezrina podría formar parte de la  
1621 maquinaria celular inducida por OmpA para promover la internalización de *C. burnetii*. Durante  
1622 este proceso se generan remodelaciones del citoesqueleto de actina producidas por las GTPasas  
1623 Rho (Salinas y col. 2015), cortactina (Rosales y col. 2012) y Arf6 (datos no publicados). A su vez la  
1624 actividad de las GTPasas Rho dependería, al menos en parte, de la regulación establecida por los  
1625 RhoGDI $\alpha$ . Por otro lado, MNM II intervendría en el ingreso de *C. burnetii* pudiendo actuar a través  
1626 de la tracción de los filamentos de actina.

**Figura 34. Mecanismo de internalización de *C. burnetii*: Modelo.** (1) Durante la etapa inicial del proceso de internalización se produce el contacto de la bacteria con receptores de la membrana plasmática de la célula hospedadora. La integrina  $\alpha_v\beta_3$  participaría en la adherencia de la bacteria y, junto a otras proteínas, activaría diversas vías de señalización intracelular asociadas a la regulación del citoesqueleto de actina. La vía de RhoA/ROCK sería inducida por la liberación de la GTPasa RhoA de su GDI y por el intercambio de nucleótidos GDP por GTP. (2) RhoA incrementaría la polimerización de actina en las cercanías a la zona de contacto bacteria-membrana plasmática de la célula hospedadora, principalmente, a través de mDia1. ROCK activaría a ezrina permitiendo el anclaje de filamentos de actina a la región de la membrana plasmática en contacto con *C. burnetii*. MNMII aportaría la fuerza motora necesaria para desarrollar las invaginaciones de membrana plasmática, a través de su interacción con los filamentos de actina. Durante el proceso de internalización, ezrina se asociaría al dominio citoplasmático de CD44 permitiendo su anclaje al citoesqueleto de actina e induciendo consecuentemente vías de señalización intracelular dependientes de este receptor. (3) A medida que progresa la internalización de *C. burnetii* el número de contactos de filamentos de actina con la membrana plasmática aumentaría, a través de la actividad de ezrina y otras proteínas de anclaje de actina. (4) Finalmente se produciría el cierre de la membrana, la formación y, finalmente, la liberación del fagosoma pequeño hacia el citoplasma.



## IV.2. Conclusiones

- CD44 interviene en el proceso de internalización de *C. burnetii*.
- La interacción de CD44 con ezrina es determinante para permitir el ingreso de *C. burnetii* a células no fagocíticas.
- Los dominios extracelular e intracelular de CD44 son necesarios para inducir el ingreso de *C. burnetii* a la célula hospedadora.
- CD44 es reclutado junto a ezrina al sitio de contacto de la bacteria.
- Ezrina forma parte de la maquinaria celular implicada en la internalización de *C. burnetii*.
- El ingreso de *C. burnetii* a la célula mediado por OmpA requiere de la actividad de ezrina.
- La participación de ezrina depende de la fosforilación de su residuo treonina 567.
- Ezrina es uno de los efectores principales de ROCK en la internalización de *C. burnetii*.
- La biogénesis y la maduración de la Vacuola que contiene a *C. burnetii* no requieren de la actividad de ezrina.



- 1642 • LIMK 2 no afecta el ingreso de *C. burnetii* a la célula hospedadora.
- 1643 • Miosina no muscular tipo II interviene en el proceso de internalización de *C. burnetii*.
- 1644 • RhoGDI $\alpha$  forma parte de la vía de señalización implicada en el ingreso de *C. burnetii* a células
- 1645 no fagocíticas.

1646

### 1647 IV.3. Perspectivas

1648 Las perspectivas planteadas a partir de este trabajo se centrarán en profundizar la  
1649 descripción del rol de CD44 en el proceso de internalización de *C. burnetii*. El receptor CD44 se  
1650 encuentra relacionado a estructuras lipídicas presentes en la membrana plasmática denominadas  
1651 “balsas lipídicas” (“Lipid Rafts”) (Oliferenko y col. 1999; Thankamony y Knudson 2006; Lee y col.  
1652 2008; Murai 2015). Estos dominios son muy sensibles a los niveles de colesterol de la membrana  
1653 ya que este lípido es su componente principal (Silvius 2003; Crane y Tamm 2004). Diversos  
1654 procesos de endocitosis se desarrollan en “Lipid Rafts” y emplean para ello una maquinaria  
1655 proteica específica (El-Sayed y Harashima 2013). Se ha determinado que distintas bacterias como  
1656 *E. coli* (Baorto y col. 1997), *S. flexneri* (Lafont y col. 2002), *L. pneumophila* (Amer y col. 2005) y  
1657 *Mycobacterias* (Gatfield y Pieters 2000) emplean estos dominios de membrana como “plataforma  
1658 de ingreso” a la célula hospedadora. En relación a ello, recientemente se ha observado que la  
1659 internalización de *C. burnetii* es dependiente de la presencia de colesterol en la célula (Gilk y col.  
1660 2013). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo y los antecedentes  
1661 mencionados previamente los próximos objetivos a desarrollar son:

- 1662 • **Describir la cinética de fosforilación del residuo 567 de ezrina endógena durante el**
- 1663 **proceso de internalización de *C. burnetii*. Establecer las posibles kinasas implicadas en**
- 1664 **la fosforilación de ezrina.**
- 1665 • **Analizar la relación entre CD44 y las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  en células infectadas con *C. burnetii*.**
- 1666 • **Determinar el nivel de CD44 presentes en dominios “Lipid Rafts” en células infectadas**
- 1667 **con *C. burnetii*.**
- 1668 • **Establecer las proteínas asociadas a la endocitosis mediada por “Lipid Rafts” implicadas**
- 1669 **en la fagocitosis de *C. burnetii*.**

1670       • **Describir la maquinaria proteica inducida por OmpA en la célula hospedadora.** Se  
1671       desarrollarán los ensayos mencionados anteriormente con las mutantes de *C. burnetii*  
1672       Tn1832 y Tn208. Además, se estudiará la fagocitosis con perlas de látex recubiertas con la  
1673       proteína OmpA purificada. Estas herramientas serán provistas por el Dr. Matteo Bonazzi  
1674       y nos permitirán comprender mejor la relación entre OmpA y las distintas proteínas  
1675       analizadas en este trabajo.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### V.1. Reactivos y plásmidos

Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), suero fetal bovino (SFB), penicilina y estreptomycin se obtuvieron de laboratorios GIBCO BRL/Life Technologies (Capital Federal, Argentina). Las transfecciones de los distintos plásmidos empleados en este estudio se realizaron con Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific - 11668027) y OptiMEM (GIBCO - 22600050). Durante las transformaciones de bacterias competentes OmniMAX™ se utilizaron los siguientes antibióticos: Ampicilina (Sigma-Aldrich - A9393) y Kanamicina (GIBCO - 11815-024). Las purificaciones de los constructos se desarrollaron siguiendo el protocolo del sistema PureYield™ Plasmid Midiprep (Promega - A2492). La toxina Faloidina acoplada a Rodamina (Thermo Fisher Scientific - R415) empleada para analizar el citoesqueleto de actina en diversos ensayos fue generosamente provista por la Dra. Patricia Romano (IHEM - CONICET). La droga blebistatina (Sigma-Aldrich - B0560) fue generosamente cedida por la Dra. Laura Delgui. El inhibidor Y-27632 (688000) se obtuvo de Calbiochem (Argentina). El silenciamiento de ezrina se realizó empleando siARN control y siARN contra ezrina obtenidos de Bioneer (Alameda, USA). Durante el desarrollo del trabajo se emplearon otros reactivos como: buffer fosfato salino o PBS 1X (137mM NaCl, 2.7 mM KCL, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH7.4), cóctel inhibidor de proteasas (Calbiochem - 539131), marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Standards (BIO-RAD - 161-0374), Mowiol (Sigma Chemical Co., Argentina).

Los anticuerpos policlonales producidos en conejo y en guinea pig anti-*C. burnetii* fueron generosamente provisto por el Dr. Robert Heinzen (Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH, Hamilton, MT, USA). Se usaron anticuerpos primarios anti-hemaglutinina (HA) (Sigma-Aldrich - H-9658), anti-ezrina (BD Biosciences - 610602), anti-FLAG (Sigma-Aldrich - F3040), anti-CD63 (BD Biosciences - 556019), anti-actina Ab-5 (BD Biosciences - 612656), anti-LAMP1 (abcam - ab25630) producidos en ratón. También se trabajó con anticuerpos primarios anti-catepsina D (abcam - ab72915), anti-glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) (abcam - ab1874), anti-myc (abcam - ab32072) generados en conejo. En el estudio se emplearon los siguientes anticuerpos secundarios: Cy3 (711-165-152), Cy5 (711-175-152) y Alexa Fluor 488 (111-545-144) anti-conejo; A. Fluor 488 (706-545-148) y A. Fluor 647 (706-605-148) anti-guinea pig; A. Fluor 488 (715-545-150) y HRP (115-035-062) anti-ratón adquiridos de Jackson Immuno Research

1706 Laboratories, Inc. (West Grove, PA, USA). El anticuerpo secundario A. Fluor 568 anti-ratón (abcam  
1707 - ab175473) fue generosamente provisto por la Dra. Laura Delgui (IHEM - CONICET).

1708 Durante el desarrollo de los diferentes ensayos realizados en este trabajo se emplearon  
1709 diferentes constructos, los cuales se detallan en la siguiente tabla informativa.

Plásmido	Función	Fuente
pEGFP-(N1)-RhoGDIα <sup>WT</sup>	Forma salvaje de RhoGDIα	Dr. Naoaki Saito: Laboratory of Molecular Pharmacology, Biosignal Research Center, Kobe University, Kobe, Japan.
pEGFP-(N1)-RhoGDIα <sup>D45A</sup>	Mutante puntual del residuo 45 de RhoGDIα que genera interacciones transitorias débiles con GTPasas Rho e incapaz de impedir la actividad de estas proteínas	Dr. Naoaki Saito: Laboratory of Molecular Pharmacology, Biosignal Research Center, Kobe University, Kobe, Japan.
pEGFP-(N1)-RhoGDIα <sup>D185A</sup>	Mutante puntual del residuo 185 de RhoGDIα que genera interacciones transitorias débiles con GTPasas Rho e incapaz de impedir la actividad de estas proteínas	Dr. Naoaki Saito: Laboratory of Molecular Pharmacology, Biosignal Research Center, Kobe University, Kobe, Japan.
pcDNA3-(HA) <sub>2</sub> -LIMK <sub>2</sub> <sup>WT</sup>	Forma salvaje de LIMK 2	Dra. Hélène Bénédetti: Centre de Biophysique Moléculaire, Centre Nationale de la Recherche Scientifique (CNRS), University of Orléans and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Orléans, France.
pcDNA3-(HA) <sub>2</sub> -LIMK <sub>2</sub> <sup>T505A</sup>	Mutante puntual del residuo 505 de LIMK 2 incapaz de ser activada por fosforilación de dicho residuo	Dra. Hélène Bénédetti: Centre de Biophysique Moléculaire, Centre Nationale de la Recherche Scientifique (CNRS), University of Orléans and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Orléans, France.
pcDNA3-(HA) <sub>2</sub> -LIMK <sub>2</sub> <sup>T505EE</sup>	Mutante puntual del residuo 505 de LIMK 2 que produce un efecto de activación de forma constitutiva de la proteína	Dra. Hélène Bénédetti: Centre de Biophysique Moléculaire, Centre Nationale de la Recherche Scientifique (CNRS), University of Orléans and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Orléans, France.
pCB6-VSVG-ezrina <sup>N<sub>terminal</sub></sup>	Mutante truncada de ezrina que solo presenta el dominio amino terminal. Su sobreexpresión produce un efecto dominante negativo	Dra. Monique Arpin: U nite de Biologie des Membranes, CNRS URA, Institut Pasteur, Departement de Biologie Moleculaire, Paris, France

pmCherry-(N1)-ezrina <sup>WT</sup>	Forma salvaje de la proteína ezrina	Producido para este trabajo en colaboración con el Dr. Matteo Bonazzi
pmCherry-(N1)-ezrina <sup>T567A</sup>	Mutante puntual de ezrina en su residuo 567 que permanece inactiva debido a que es incapaz de ser fosforilada	Producido para este trabajo en colaboración con el Dr. Matteo Bonazzi
pmCherry-(N1)-ezrina <sup>T567D</sup>	Mutante puntual de ezrina en su residuo 567 que simula una fosforilación permanente de la proteína.	Producido para este trabajo en colaboración con el Dr. Matteo Bonazzi
pSuper-shARN <sup>Control</sup>	Pequeño oligómero inespecífico incapaz de silenciar a CD44 en células transfectadas.	Dra. Joanna Dzwonek: Laboratory of Molecular and Systemic Neuromorphology, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Pasteura 3, Warsaw, Poland.
pSuper-shARN <sup>CD44</sup>	Pequeño oligómero específico para silenciar a CD44 en células transfectadas.	Dra. Joanna Dzwonek: Laboratory of Molecular and Systemic Neuromorphology, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Pasteura 3, Warsaw, Poland.
pSuper-GFP-shARN <sup>Rescate</sup>	CD44 resistente al silenciamiento producido por el plásmido pSuper-shARN <sup>CD44</sup> .	Dra. Joanna Dzwonek: Laboratory of Molecular and Systemic Neuromorphology, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Pasteura 3, Warsaw, Poland.
pFLAGmyc-CMV-21-CD44 <sup>WT</sup>	Forma salvaje del receptor CD44	Dr. Peter Herrlich: Leibniz Institute for Age Research, Fritz Lipmann Institute, Beutenbergstr, Jena, Germany
pFLAGmyc-CMV-21-CD44 <sup>KR</sup>	Mutante del receptor en residuos claves para su interacción con proteínas ERM. No puede unirse a ERMs.	Dr. Peter Herrlich: Leibniz Institute for Age Research, Fritz Lipmann Institute, Beutenbergstr, Jena, Germany
pFLAGmyc-CMV-21-CD44 <sup>ΔE</sup>	Mutante truncada de CD44 carente del dominio extracelular.	Dr. Peter Herrlich: Leibniz Institute for Age Research, Fritz Lipmann Institute, Beutenbergstr, Jena, Germany
pFLAGmyc-CMV-21-CD44 <sup>ΔICD</sup>	Mutante truncada de CD44 carente del dominio intracelular.	Dr. Peter Herrlich: Leibniz Institute for Age Research, Fritz Lipmann Institute, Beutenbergstr, Jena, Germany

1710

## 1711 V.2. Cultivo celular

1712 Células HeLa y Vero (ABAC, Buenos Aires, Argentina) se cultivaron en frascos de cultivo

1713 T25 con medio DMEM suplementado con 10% de SFB inactivado por calor, 2.2 g/l bicarbonato de

1714 sodio, 2 mM glutamina y 0.1% penicilina-estreptomicina, pH 7 a 37°C en atmósfera de 95% de  
1715 aire y 5% de CO<sub>2</sub>.

### 1716 V.3. Propagación y purificación de *Coxiella burnetii*

1717 *Coxiella burnetii* Clone 4 de la cepa Nine Mile II (bacteria avirulenta) provista por Ted  
1718 Hackstadt (Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH, Hamilton, MT, USA) se manipuló en un  
1719 ambiente de bioseguridad tipo 2. Células Vero se cultivaron en frascos T75 en medio DMEM  
1720 suplementado con 5% de SFB, 0.22 g/l de bicarbonato de sodio y 20 mM Hepes, pH 7(MfbH) a  
1721 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos se infectaron con una suspensión de *C. burnetii* diluida en MfbH  
1722 por 6 días a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Luego, las células se lavaron 3 veces con PBS e incubaron por 15  
1723 minutos con H<sub>2</sub>O bidestilada esteril para producir la lisis osmótica de las células. Al término de la  
1724 incubación se agregó buffer Hanks 5X (0.137 M NaCl, 5.4 mM KCl, 0.25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.44 mM  
1725 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgSO<sub>4</sub>, 4.2 mM NaHCO<sub>3</sub>), las células se “escrapearon” y se  
1726 pasaron 5 veces a través de una aguja 22G acoplada a una jeringa de tuberculina. El lisado celular  
1727 obtenido se transfirió a un tubo tipo Falcón de 50 ml, se incubó en un baño ultrasónico con agua  
1728 y hielo durante 10 min y se centrifugó 5 min a 3200 x g a 4°C. El sobrenadante obtenido se  
1729 centrifugó nuevamente durante 30 min a 4°C y 32000 x g de velocidad. El “pellet” resultante se  
1730 resuspendió en 1 ml de DMEM y se disgregó mediante 10 pasajes a través de una aguja 22G  
1731 acoplada a una jeringa de tuberculina. La suspensión enriquecida en *C. burnetii* se alicuotó y  
1732 congeló a -70°C.

1733 Las mutantes Tn1832 y Tn208 de *C. burnetii* Clone 4 de la cepa Nine Mile II (Martinez y  
1734 col. 2014) provista por Matteo Bonazzi (Biologie cellulaire des infections bactériennes, IRIM,  
1735 Université Montpellier, CNRS, Montpellier, France) se manipularon en un ambiente de  
1736 bioseguridad tipo 2. Para su propagación se inocularon en medio de cultivo ACCM-2 (medio  
1737 cisteína citrato acidificado 2)(Omsland y col. 2011; Omsland y col. 2009) suplementado con  
1738 cloranfenicol (3 µg/ml) y se mantuvieron a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 2.5% de O<sub>2</sub>  
1739 durante 8 días en frascos T150. Completado el crecimiento de la bacteria el medio de cultivo se  
1740 centrifugó a 4500 rpm por 40 min a 4°C, el “pellet” resultante se resuspendió en 1 ml de glicerol,  
1741 se alicuotó y guardó a -70°C para su posterior utilización.

1742 Durante el transcurso de este manuscrito se refirió a la forma salvaje de la bacteria como  
1743 *C. burnetii* o *C. burnetii* WT mientras que cuando se trabaje con mutantes se indicarán como  
1744 Tn1832 o Tn208.

#### V.4. Ensayos de internalización de *Coxiella burnetii*

Veinte mil células HeLa se sembraron sobre cubreobjetos estériles en placas de 24 pocillos y se mantuvieron como se menciona previamente en medio DMEM toda la noche. Las células se transfectaron con los plásmidos indicados en cada uno de los ensayos por 2 h utilizando OptiMEM y Lipofectamina 2000. Las células se lavaron con PBS y se mantuvieron 16 h en medio DMEM a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> para asegurar la expresión de la proteína codificada en el constructo. En el caso del silenciamiento de ezrina luego de la transfección las células se mantuvieron como se indica previamente, pero durante 40 h, según lo establecido por el fabricante para lograr un “knockdown” eficiente. Luego se infectaron con una suspensión de *C. burnetii* (“Multiplicity of infection”: 20-40) diluida en medio MfbH. Se centrifugaron durante 10 min a 400 x g a una temperatura de 4°C para promover el contacto de *C. burnetii* con la célula hospedadora. Posteriormente las células se lavaron con PBS para eliminar bacterias no adheridas, se agregó medio MfbH fresco e incubó por 6 h a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. El mismo procedimiento fue empleado al trabajar con las bacterias mutantes Tn1832 y Tn208 purificadas.

Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% a 37°C por 20 minutos y se lavaron con PBS al cual se le adicionó 0.5% de seroalbumina bovina (PBS-BSA). El bloqueo de los preparados se realizó durante 30 min a temperatura ambiente con PBS suplementado (10% de SFB y 10 mg/ml NH<sub>4</sub>Cl). Luego se procedió a realizar la marca de las bacterias extracelulares trabajando en condiciones no permeabilizantes (buffer sin detergentes). Para ello se incubó con un anticuerpo anti-*C. burnetii* (1:1000) y anticuerpo secundario correspondiente acoplado a Alexa Fluor 647 o Cy5 (1:500) diluidos en PBS-BSA. Seguidamente se permeabilizó las células realizando 3 lavados de 10 min con PBS-BSA suplementado con saponina (0.05%). Una vez permeabilizadas las células se detectaron las bacterias totales en cada uno de los preparados. Para ello se incubaron con un anticuerpo anti-*C. burnetii* (1:1000) y luego con el anticuerpo secundario indicado acoplado a Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 o Cy3 diluidos en PBS-BSA con saponina (0.05%). Además, solo en aquellos ensayos que lo requerían se detectó la proteína sobreexpresada fusionada una etiqueta (“tag”) no fluorescente (HA, myc, FLAG, VSV-G) con el anticuerpo primario y secundario correspondiente. Por último, las células se montaron en Mowiol y se examinaron por microscopía de fluorescencia. Terminado este proceso las bacterias intracelulares presentan una única marca mientras que las extracelulares muestran doble marca.

## V.5. Ensayos de biogénesis y maduración de la Vacuola que Contiene a *Coxiella burnetii*

Se sembraron 20000 células HeLa en cubreobjetos estériles previamente depositados en placas de 24 pocillos y se mantuvieron en medio DMEM durante toda la noche. Luego las células se transfectaron con los plásmidos que codifican ezrina<sup>WT</sup>, ezrina<sup>T567A</sup>, ezrina<sup>T567D</sup> o el vector mCherry durante 2 h en medio OptiMEM empleando Lipofectamina 2000. Terminada la transfección se infectaron con una suspensión de *C. burnetii* (MOI: 20-40) diluida en medio MfbH y se mantuvieron durante 16 h. Posteriormente las células se lavaron con PBS para eliminar las bacterias que pudieran permanecer en el medio de cultivo y se les agregó medio MfbH fresco. A este momento de la infección se lo estableció como tiempo 0 h post-infección. En algunos ensayos este proceso se extendió durante 48 h más para analizar la formación y maduración de la VCC en tiempos tardíos (48 h post-infección).

Transcurrido el intervalo de tiempo indicado en cada ensayo las células se lavaron y fijaron con paraformaldehído al 4% a 37°C por 20 minutos. Luego los preparados se lavaron con PBS y se bloquearon con PBS suplementado (10% de SFB y 10 mg/ml NH<sub>4</sub>Cl) durante 30 min a temperatura ambiente. Las células se permeabilizaron con PBS-BSA con saponina (0.05%) y se marcaron las bacterias con anticuerpos primarios anti-*C. burnetii* (1:1000) producidos en guinea pig. En los ensayos de maduración se empleó anti-catepsina D (1:200) generado en conejo, anti-CD63 (1:200) y anti-Lamp1 (1:200) desarrollado en ratón. Los anticuerpos secundarios utilizados en los distintos ensayos fueron anti-guinea pig acoplado a Alexa Fluor 647 (1:500), anti-ratón y anti-conejo conjugados a Alexa Fluor 488 (1:500). Finalmente, las células se montaron en Mowiol y se analizaron por microscopía de fluorescencia.

## V.6. Tinción con Faloidina Rodamina

Los tratamientos con Faloidina Rodamina para marcar los microfilamentos en los ensayos indicados se realizaron posteriormente a las incubaciones con anticuerpos. Los preparados se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con diluciones de la toxina en PBS al 1% de BSA (1:100). Luego se realizaron lavados extensivos con PBS-BSA para eliminar la toxina excedente y se montaron los preparados con Mowiol.

## V.7. Tratamiento con los inhibidores Y-27632 y blebistatina

Las alícuotas de blebistatina se prepararon disolviendo la droga en DMSO mientras que en el caso de Y-27632 se empleó H<sub>2</sub>O. En cada ensayo las células HeLa se trataron durante una



1806 hora con blebistatina (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M) o Y-27632 (10  $\mu$ M) diluidos en MfbH. Luego se  
1807 infectaron con *C. burnetii* manteniendo durante todo el proceso (6 horas) la presencia del  
1808 inhibidor correspondiente. Como control negativo de cada ensayo se empleó una dilución en  
1809 MfbH del compuesto en que se resuspendió cada inhibidor (DMSO o H<sub>2</sub>O). Finalmente se  
1810 sometieron los preparados al protocolo de inmunofluorescencia empleado para el análisis de  
1811 internalización de *C. burnetii*.

## 1812 V.8. Análisis del silenciamiento de ezrina por “Western 1813 blot”

1814 Lisados totales de células HeLa transfectadas con siARN contra ezrina o siARN control se  
1815 analizaron empleando el protocolo convencional de SDS-PAGE. Posteriormente, las proteínas se  
1816 transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare Life Sciences - 10401197). Las  
1817 membranas se bloquearon con la solución PBS-Tween 20 (PBS 0.1% Tween 20) al 5% de leche  
1818 descremada por 1 h a temperatura ambiente y luego se incubaron con el anticuerpo primario anti-  
1819 ezrina (1:500) o anti-actina Ab5 (1:5000) toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron con PBS-  
1820 Tween 20 y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a HRP (1:10000). La  
1821 detección de las proteínas se realizó usando un sistema ECL-Western blotting (Amershan Corp.,  
1822 Corston, UK) según las especificaciones del fabricante. Para realizar la densitometría de bandas se  
1823 utilizó el programa ImageJ (NIH [<http://rsb.info.nih.gov/ij>]) y los valores obtenidos se normalizaron  
1824 con respecto a actina total para cada muestra. Los datos mostrados son representativos de dos  
1825 experimentos independientes.

## 1826 V.9. Microscopía de fluorescencia y procesamiento de 1827 imágenes

1828 En los ensayos de internalización de *C. burnetii* los preparados se analizaron por  
1829 microscopía de fluorescencia confocal utilizando un microscopio Nikon C1 Confocal Microscope  
1830 System con objetivo 60X, provisto del software EZ-C1 (Nikon, Japón). Cada una de las imágenes  
1831 tomadas se compone de al menos 10 planos focales obtenidos a lo largo del eje z (“Z-stacks”).  
1832 Dichas imágenes se sometieron a la herramienta “Z Project” del programa ImageJ para producir  
1833 una única figura que represente la suma de todos los planos focales. Sobre estas imágenes se  
1834 realizó la cuantificación mencionada más adelante. De la misma manera se procedió para analizar  
1835 las pequeñas VCC observadas a 0 horas post-infección.

1836 Las imágenes de los ensayos realizados para analizar la VCC a 48 h post-infección fueron  
1837 obtenidas con un microscopio Nikon Eclipse TE2000 usando el software Metamorph, serie 6.1  
1838 (Universal Images Corporation). Sobre estas imágenes se desarrolló la posterior cuantificación de  
1839 los parámetros de interés.

1840 Las imágenes representativas de cada ensayo se obtuvieron utilizando un microscopio  
1841 confocal Olympus FV1000 y su respectivo programa de trabajo FV 10-ASW 1.7 (Olympus, Japón).  
1842 Posteriormente se sometieron al proceso de deconvolución empleando el programa ImageJ.

## 1843 V.10. Cuantificación de los parámetros analizados durante 1844 la internalización y la formación de la VCC

1845 A partir de las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia se cuantificaron los  
1846 parámetros indicados en cada ensayo utilizando el software ImageJ. Para estudiar la biogénesis  
1847 de la VCC se determinó el tamaño (diámetro y área) y número de VCC por célula a 48 h post-  
1848 infección. En el caso de los ensayos de maduración se cuantificó el número de VCC que  
1849 presentaban los marcadores CD63, catepsina D o LAMP1 a diferentes tiempos de infección (0 y 48  
1850 h post-infección). Para analizar el ingreso de *C. burnetii* a la célula se determinó el cociente entre  
1851 bacterias con una única marca (intracelulares) y las bacterias totales (intracelulares +  
1852 extracelulares) presentes en una célula. El valor obtenido fue multiplicado por 100 para obtener  
1853 el porcentaje de internalización por célula. Además, se cuantificó el número de bacterias totales  
1854 obtenido de la sumatoria de los microorganismos intracelulares y extracelulares.

## 1855 V.11. Análisis estadístico

1856 Las cuantificaciones realizadas se expresan como medias  $\pm$  error medio estándar, a partir  
1857 de tres ensayos independientes, contando treinta células en cada uno de ellos. Los datos  
1858 obtenidos se analizaron por el test de ANOVA en conjunto con el test de Dunnett, mediante el  
1859 programa GraphPad Prism6 (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

1860

1861

1862

## 1863 VI. BIBLIOGRAFÍA

- 1864 1. Abrami, Laurence, Shihui Liu, Pierre Cosson, Stephen H. Leppla, and F. Gisou van der Goot. 2003. "Anthrax  
1865 Toxin Triggers Endocytosis of Its Receptor via a Lipid Raft-mediated Clathrin-Dependent Process." *The*  
1866 *Journal of Cell Biology* 160 (3): 321–28. doi:10.1083/jcb.200211018.
- 1867 2. Acevedo, Karla, Nathalie Moussi, Rong Li, Priscilla Soo, and Ora Bernard. 2006. "LIM Kinase 2 Is Widely  
1868 Expressed in All Tissues." *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 54 (5): 487–501.  
1869 doi:10.1369/jhc.5C6813.2006.
- 1870 3. Aguilar-Cuenca, Rocio, Alba Juanes-Garcia, and Miguel Vicente-Manzanares. 2014. "Myosin II in  
1871 Mechanotransduction: Master and Commander of Cell Migration, Morphogenesis, and Cancer." *Cellular*  
1872 *and Molecular Life Sciences : CMLS* 71 (3). Switzerland: 479–92. doi:10.1007/s00018-013-1439-5.
- 1873 4. Aguilera, Milton, Romina Salinas, Eliana Rosales, Sergio Carminati, Maria I. Colombo, and Walter Berón.  
1874 2009. "Actin Dynamics and Rho GTPases Regulate the Size and Formation of Parasitophorous Vacuoles  
1875 Containing Coxiella Burnetii." *Infection and Immunity* 77 (10): 4609–20. doi:10.1128/IAI.00301-09.
- 1876 5. Algrain, M, O Turunen, A Vaheri, D Louvard, and M Arpin. 1993. "Ezrin Contains Cytoskeleton and  
1877 Membrane Binding Domains Accounting for Its Proposed Role as a Membrane-Cytoskeletal Linker." *The*  
1878 *Journal of Cell Biology* 120 (1): 129–39.
- 1879 6. Almeida, Maria Teresa, Francisco S. Mesquita, Rui Cruz, Hugo Osório, Rafael Custódio, Cláudia Brito,  
1880 Didier Vingadassalom, y col. 2015. "Src-Dependent Tyrosine Phosphorylation of Non-Muscle Myosin Heavy  
1881 Chain-IIA Restricts Listeria Monocytogenes Cellular Infection." *Journal of Biological Chemistry* 290 (13):  
1882 8383–95. doi:10.1074/jbc.M114.591313.
- 1883 7. Alrutz, M A, A Srivastava, K W Wong, C D'Souza-Schorey, M Tang, L E Ch'Ng, S B Snapper, and R R Isberg.  
1884 2001. "Efficient Uptake of Yersinia Pseudotuberculosis via Integrin Receptors Involves a Rac1-Arp 2/3  
1885 Pathway That Bypasses N-WASP Function." *Molecular Microbiology* 42 (3). England: 689–703.
- 1886 8. Alrutz, Michael A, and Ralph R Isberg. 1998. "Involvement of Focal Adhesion Kinase in Invasin-Mediated  
1887 Uptake." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (23). The  
1888 National Academy of Sciences: 13658–63.
- 1889 9. Alvarez-Dominguez, Carmen, Fidel Madrazo-Toca, Lorena Fernandez-Prieto, Joël Vandekerckhove,  
1890 Eduardo Pareja, Raquel Tobes, Maria Teresa Gomez-Lopez, y col. 2008. "Characterization of a Listeria  
1891 Monocytogenes Protein Interfering with Rab5a." *Traffic* 9 (3): 325–37. doi:10.1111/j.1600-  
1892 0854.2007.00683.x.
- 1893 10. Amano, M, K Chihara, N Nakamura, T Kaneko, Y Matsuura, and K Kaibuchi. 1999. "The COOH Terminus  
1894 of Rho-Kinase Negatively Regulates Rho-Kinase Activity." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (45).  
1895 United States: 32418–24.
- 1896 11. Amano, T, K Tanabe, T Eto, S Narumiya, and K Mizuno. 2001. "LIM-Kinase 2 Induces Formation of Stress  
1897 Fibres, Focal Adhesions and Membrane Blebs, Dependent on Its Activation by Rho-Associated Kinase-  
1898 Catalysed Phosphorylation at Threonine-505." *The Biochemical Journal* 354 (Pt 1): 149–59.  
1899 doi:10.1042/0264-6021:3540149.
- 1900 12. Amash, Alaa, Lin Wang, Yawen Wang, Varsha Bhakta, Gregory D. Fairn, Ming Hou, Jun Peng, William P.  
1901 Sheffield, and Alan H. Lazarus. 2016. "CD44 Antibody Inhibition of Macrophage Phagocytosis Targets Fcγ

- 1902 Receptor- and Complement Receptor 3-Dependent Mechanisms." *The Journal of Immunology* 196 (8):  
1903 3331-40. doi:10.4049/jimmunol.1502198.
- 1904 13. Amer, Amal O, Brenda G Byrne, and Michele S Swanson. 2005. "Macrophages Rapidly Transfer Pathogens  
1905 from Lipid Raft Vacuoles to Autophagosomes." *Autophagy* 1 (1). Taylor & Francis: 53-58.  
1906 doi:10.4161/auto.1.1.1589.
- 1907 14. Angelakis, Emmanouil, and Didier Raoult. 2010. "Q Fever." *Veterinary Microbiology* 140 (3-4): 297-309.  
1908 doi:10.1016/j.vetmic.2009.07.016.
- 1909 15. Arii, Jun, Hideo Goto, Tadahiro Suenaga, Masaaki Oyama, Hiroko Kozuka-Hata, Takahiko Imai, Atsuko  
1910 Minowa, y col. 2010. "Non-Muscle Myosin IIA Is a Functional Entry Receptor for Herpes Simplex Virus-1."  
1911 *Nature* 467 (7317). England: 859-62. doi:10.1038/nature09420.
- 1912 16. Arpin, Monique, Dafne Chirivino, Alexandra Naba, and Ingrid Zwaenepoel. 2011. "Emerging Role for ERM  
1913 Proteins in Cell Adhesion and Migration." *Cell Adh Migr* 5 (2): 199-206. doi:10.4161/cam.5.2.15081.
- 1914 17. Asrat, Seblewongel, Dennise A. de Jesús, Andrew D. Hempstead, Vinay Ramabhadran, and Ralph R. Isberg.  
1915 2014. "Bacterial Pathogen Manipulation of Host Membrane Trafficking." *Annual Review of Cell and*  
1916 *Developmental Biology* 30 (1): 79-109. doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013439.
- 1917 18. Auvinen, Eeva, Niina Kivi, and Antti Vaheri. 2007. "Regulation of Ezrin Localization by Rac1 and PIPK in  
1918 Human Epithelial Cells." *Experimental Cell Research* 313 (4): 824-33. doi:10.1016/j.yexcr.2006.12.002.
- 1919 19. Baca, O G, D A Klassen, and A S Aragon. 1993. "Entry of Coxiella Burnetii into Host Cells." *Acta Virologica*  
1920 37 (2-3): 143-55.
- 1921 20. Baorto, D M, Z Gao, R Malaviya, M L Dustin, A van der Merwe, D M Lublin, and S N Abraham. 1997.  
1922 "Survival of FimH-Expressing Enterobacteria in Macrophages Relies on Glycolipid Traffic." *Nature* 389  
1923 (6651). England: 636-39. doi:10.1038/39376.
- 1924 21. Bartra, Sara Schesser, Xin Gong, Cherish D Lorica, Chaitanya Jain, Manoj K.M. Nair, Dieter Schifferli,  
1925 Lianfen Qian, Zhongwei Li, Gregory V Plano, and Kurt Schesser. 2012. "The Outer Membrane Protein A  
1926 (OmpA) of Yersinia Pestis Promotes Intracellular Survival and Virulence in Mice." *Microbial Pathogenesis* 52  
1927 (1). England: 41-46. doi:10.1016/j.micpath.2011.09.009.
- 1928 22. Baumgartner, Martin, Amy L Sillman, Elizabeth M Blackwood, Jyoti Srivastava, Nikki Madson, James W  
1929 Schilling, Jocelyn H Wright, and Diane L Barber. 2006. "The Nck-Interacting Kinase Phosphorylates ERM  
1930 Proteins for Formation of Lamellipodium by Growth Factors." *Proceedings of the National Academy of*  
1931 *Sciences of the United States of America* 103 (36). National Academy of Sciences: 13391-96.  
1932 doi:10.1073/pnas.0605950103.
- 1933 23. Beare, Paul A, Stacey D Gilk, Charles L Larson, Joshua Hill, Christopher M Stead, Anders Omsland, Diane C  
1934 Cockrell, Dale Howe, Daniel E Voth, and Robert A Heinzen. 2011. "Dot/Icm Type IVB Secretion System  
1935 Requirements for Coxiella Burnetii Growth in Human Macrophages." *mBio* 2 (4). American Society for  
1936 Microbiology: e00175-11-e00175-11. doi:10.1128/mBio.00175-11.
- 1937 24. Beatty, Wendy L. 2006. "Trafficking from CD63-Positive Late Endocytic Multivesicular Bodies Is Essential  
1938 for Intracellular Development of Chlamydia Trachomatis." *Journal of Cell Science* 119 (2): 350-59.  
1939 doi:10.1242/jcs.02733.
- 1940 25. Bechah, Yassina, Johanna Verneau, Amira Ben Amara, Abdoulaye O. Barry, Catherine Lépolard, Vincent  
1941 Achard, Laurence Panicot-Dubois, y col. 2014. "Persistence of Coxiella Burnetii, the Agent of Q Fever, in

- 1942 Murine Adipose Tissue.” Edited by Dario S. Zamboni. *PLoS ONE* 9 (5). Public Library of Science: e97503.  
1943 doi:10.1371/journal.pone.0097503.
- 1944 26. Behrmann, Elmar, Mirco Müller, Pawel A Penczek, Hans Georg Mannherz, Dietmar J Manstein, and Stefan  
1945 Raunser. 2012. “Structure of the Rigor Actin-Tropomyosin-Myosin Complex.” *Cell* 150 (2): 327–38.  
1946 doi:10.1016/j.cell.2012.05.037.
- 1947 27. Berón, Walter, Maximiliano G Gutierrez, Michel Rabinovitch, Maria I Colombo, and Walter Bero. 2002a.  
1948 “Coxiella Burnetii Localizes in a Rab7-Labeled Compartment with Autophagic Characteristics Coxiella  
1949 Burnetii Localizes in a Rab7-Labeled Compartment with Autophagic Characteristics.”  
1950 doi:10.1128/IAI.70.10.5816.
- 1951 28. Berryman, M, Z Franck, and A Bretscher. 1993. “Ezrin Is Concentrated in the Apical Microvilli of a Wide  
1952 Variety of Epithelial Cells Whereas Moesin Is Found Primarily in Endothelial Cells.” *Journal of Cell Science*  
1953 105 ( Pt 4 (August). England: 1025–43.
- 1954 29. Betapudi, Venkaiah. 2014. “Life without Double-Headed Non-Muscle Myosin II Motor Proteins.” *Frontiers*  
1955 *in Chemistry* 2 (July): 1–13. doi:10.3389/fchem.2014.00045.
- 1956 30. Bierne, Hélène, Edith Gouin, Pascal Roux, Pico Caroni, Helen L. Yin, and Pascale Cossart. 2001. “A Role for  
1957 Cofilin and LIM Kinase in Listeria-Induced Phagocytosis.” *Journal of Cell Biology* 155 (1): 101–12.  
1958 doi:10.1083/jcb.200104037.
- 1959 31. Blanchoin, Laurent, Rajaa Boujemaa-Paterski, Cécile Sykes, and Julie Plastino. 2014. “Actin Dynamics,  
1960 Architecture, and Mechanics in Cell Motility.” *Physiological Reviews* 94 (1): 235 LP-263.
- 1961 32. Bock, J B, and R H Scheller. 1999. “SNARE Proteins Mediate Lipid Bilayer Fusion.” *Proceedings of the*  
1962 *National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (22). National Academy of Sciences: 12227–  
1963 29.
- 1964 33. Bohdanowicz, Michal, and Sergio Grinstein. 2013. “Role of Phospholipids in Endocytosis, Phagocytosis, and  
1965 Macropinocytosis.” *Physiological Reviews* 93 (1): 69–106. doi:10.1152/physrev.00002.2012.
- 1966 34. Bohdanowicz, Michal, Daniel Schlam, Martin Hermansson, David Rizzuti, Gregory D Fairn, Takehiko  
1967 Ueyama, Pentti Somerharju, Guangwei Du, and Sergio Grinstein. 2013. “Phosphatidic Acid Is Required for  
1968 the Constitutive Ruffling and Macropinocytosis of Phagocytes.” *Molecular Biology of the Cell* 24 (11): 1700–  
1969 1712, S1-7. doi:10.1091/mbc.E12-11-0789.
- 1970 35. Boulant, Steeve, Comert Kural, Jean-Christophe Zeeh, Florent Ubelmann, and Tomas Kirchhausen. 2011.  
1971 “Actin Dynamics Counteract Membrane Tension during Clathrin-Mediated Endocytosis.” *Nat Cell Biol* 13  
1972 (9). Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.: 1124–31.  
1973 doi:10.1038/ncb2307.
- 1974 36. Boulter, Etienne, Rafael Garcia-Mata, Christophe Guilluy, Adi Dubash, Guendalina Rossi, Patrick J  
1975 Brennwald, and Keith Burridge. 2010. “Regulation of RhoGTPase Crosstalk, Degradation and Activity by  
1976 RhoGDI1.” *Nature Cell Biology* 12 (5): 477–83. doi:10.1038/ncb2049.
- 1977 37. Boureux, Anthony, Emmanuel Vignal, Sandrine Faure, and Philippe Fort. 2007. “Evolution of the Rho  
1978 Family of Ras-like GTPases in Eukaryotes.” *Molecular Biology and Evolution* 24 (1). United States: 203–16.  
1979 doi:10.1093/molbev/msl145.

- 1980 38. Bourguignon, Lilly Y W. 2008. "Hyaluronan-Mediated CD44 Activation of RhoGTPase Signaling and  
1981 Cytoskeleton Function Promotes Tumor Progression." *Seminars in Cancer Biology* 18 (4). NIH Public  
1982 Access: 251–59. doi:10.1016/j.semcancer.2008.03.007.
- 1983 39. Bozza, William P, Yaqin Zhang, Kory Hallett, Leslie A Rivera Rosado, and Baolin Zhang. 2015. "RhoGDI  
1984 Deficiency Induces Constitutive Activation of Rho GTPases and COX-2 Pathways in Association with Breast  
1985 Cancer Progression." *Oncotarget* 6 (32). Impact Journals LLC: 32723–36.
- 1986 40. Bretscher, A. 1983. "Purification of an 80,000-Dalton Protein That Is a Component of the Isolated  
1987 Microvillus Cytoskeleton, and Its Localization in Nonmuscle Cells." *The Journal of Cell Biology* 97 (2).  
1988 United States: 425–32.
- 1989 41. Bretscher, a, D Reczek, and M Berryman. 1997. "Ezrin: A Protein Requiring Conformational Activation to  
1990 Link Microfilaments to the Plasma Membrane in the Assembly of Cell Surface Structures." *Journal of Cell*  
1991 *Science* 110 ( Pt 2: 3011–18.
- 1992 42. Bretscher, M S, and C Aguado-Velasco. 1998. "EGF Induces Recycling Membrane to Form Ruffles." *Current*  
1993 *Biology : CB* 8 (12): 721–24.
- 1994 43. Brown, Gordon D, Philip R Taylor, Delyth M Reid, Janet A Willment, David L Williams, Luisa Martinez-  
1995 Pomares, Simon Y.C. Wong, and Siamon Gordon. 2002. "Dectin-1 Is A Major  $\beta$ -Glucan Receptor On  
1996 Macrophages." *The Journal of Experimental Medicine* 196 (3): 407–12. doi:10.1084/jem.20020470.
- 1997 44. Brown, Kelly L., Darlene Birkenhead, Jacqueline C.Y. Lai, Liheng Li, Ruihong Li, and Pauline Johnson. 2005.  
1998 "Regulation of Hyaluronan Binding by F-Actin and Colocalization of CD44 and Phosphorylated  
1999 Ezrin/radixin/moesin (ERM) Proteins in Myeloid Cells." *Experimental Cell Research* 303 (2): 400–414.  
2000 doi:10.1016/j.yexcr.2004.10.002.
- 2001 45. Bruce-Staskal, Pamela J, Cheryl L Weidow, Jennifer J Gibson, and Amy H Bouton. 2002. "Cas, Fak and Pyk2  
2002 Function in Diverse Signaling Cascades to Promote Yersinia Uptake." *Journal of Cell Science* 115 (Pt 13).  
2003 England: 2689–2700.
- 2004 46. Bruno, Silvia, Marina Fabbi, Micaela Tiso, Barbara Santamaria, Fabio Ghiotto, Daniele Saverino, Claudya  
2005 Tenca, y col. 2000. "Cell Activation via CD44 Occurs in Advanced Stages of Squamous Cell Carcinogenesis ."   
2006 *Carcinogenesis* 21 (5): 893–900. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/21.5.893>.
- 2007 47. Bucci, C, R G Parton, I H Mather, H Stunnenberg, K Simons, B Hoflack, and M Zerial. 1992. "The Small  
2008 GTPase rab5 Functions as a Regulatory Factor in the Early Endocytic Pathway." *Cell* 70 (5): 715–28.
- 2009 48. Buccione, Roberto, James D Orth, and Mark A McNiven. 2004. "Foot and Mouth: Podosomes, Invadopodia  
2010 and Circular Dorsal Ruffles." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5 (8): 647–57. doi:10.1038/nrm1436.
- 2011 49. Burridge, Keith, and Christophe Guilluy. 2016. "Focal Adhesions, Stress Fibers and Mechanical Tension."  
2012 *Experimental Cell Research* 343 (1): 14–20. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.029>.
- 2013 50. Cairo, Christopher W, Rossen Mirchev, David E Golan, J. Kallen, J. Kallen, C. Bruns, S. Cottens, y col. 2006.  
2014 "Cytoskeletal Regulation Couples LFA-1 Conformational Changes to Receptor Lateral Mobility and  
2015 Clustering." *Immunity* 25 (2). Elsevier: 297–308. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.012.
- 2016 51. Callaghan, J, A Simonsen, J M Gaullier, B H Toh, and H Stenmark. 1999. "The Endosome Fusion Regulator  
2017 Early-Endosomal Autoantigen 1 (EEA1) Is a Dimer." *The Biochemical Journal* 338 ( Pt 2 (2). Portland Press  
2018 Limited: 539–43. doi:10.1042/BJ3380539.

- 2019 52. Campoy, Emanuel Martín, María Eugenia Mansilla, and María Isabel Colombo. 2013. "Endocytic SNAREs  
2020 Are Involved in Optimal *Coxiella Burnetii* Vacuole Development." *Cellular Microbiology* 15 (6): 922–41.  
2021 doi:10.1111/cmi.12087.
- 2022 53. Campoy, Emanuel Martín, Felipe Carlos Martín Zoppino, and María Isabel Colombo. 2011. "The Early  
2023 Secretory Pathway Contributes to the Growth of the *Coxiella*-Replicative Niche." *Infection and Immunity* 79  
2024 (1). American Society for Microbiology: 402–13. doi:10.1128/IAI.00688-10.
- 2025 54. Canals, Daniel, Patrick Roddy, and Yusuf A Hannun. 2012. "Protein Phosphatase 1 $\alpha$  Mediates Ceramide-  
2026 Induced ERM Protein Dephosphorylation: A NOVEL MECHANISM INDEPENDENT OF  
2027 PHOSPHATIDYLINOSITOL 4, 5-BIPHOSPHATE (PIP(2)) AND MYOSIN/ERM PHOSPHATASE." *The*  
2028 *Journal of Biological Chemistry* 287 (13). 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814, U.S.A.: American Society  
2029 for Biochemistry and Molecular Biology: 10145–55. doi:10.1074/jbc.M111.306456.
- 2030 55. Cant, Sarah H, and Julie A Pitcher. 2005. "G Protein-Coupled Receptor Kinase 2-Mediated Phosphorylation  
2031 of Ezrin Is Required for G Protein-Coupled Receptor-Dependent Reorganization of the Actin Cytoskeleton."  
2032 *Molecular Biology of the Cell* 16 (7). United States: 3088–99. doi:10.1091/mbc.E04-10-0877.
- 2033 56. Capo, Christian, Frederik P Lindberg, Sonia Meconi, Y Zaffran, Gratiela Tardei, Eric J Brown, Didier Raoult,  
2034 and J L Mege. 1999. "Subversion of Monocyte Functions by *Coxiella Burnetii*: Impairment of the Cross-Talk  
2035 between  $\alpha$ v $\beta$ 3 Integrin and CR3." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163 (11): 6078–85.
- 2036 57. Carey, Kimberly L., Hayley J. Newton, Anja Lührmann, and Craig R. Roy. 2011. "The *Coxiella Burnetii*  
2037 Dot/Icm System Delivers a Unique Repertoire of Type IV Effectors into Host Cells and Is Required for  
2038 Intracellular Replication." Edited by Peter Christie. *PLoS Pathogens* 7 (5): e1002056.  
2039 doi:10.1371/journal.ppat.1002056.
- 2040 58. Carlier, M F, and D Pantaloni. 1986. "Direct Evidence for ADP-Pi-F-Actin as the Major Intermediate in  
2041 ATP-Actin Polymerization. Rate of Dissociation of Pi from Actin Filaments." *Biochemistry* 25 (24): 7789–92.
- 2042 59. Chandrasekar, Indra, Zoe M. Goeckeler, Stephen G. Turney, Peter Wang, Robert B. Wysolmerski, Robert S.  
2043 Adelstein, and Paul C. Bridgman. 2014. "Nonmuscle Myosin II Is a Critical Regulator of Clathrin-Mediated  
2044 Endocytosis." *Traffic* 15 (4): 418–32. doi:10.1111/tra.12152.
- 2045 60. Chen, Xiaodong, Jahan Ali Khajeh, Jeong Ho Ju, Yogesh K. Gupta, Christopher B. Stanley, Changwoo Do,  
2046 William T. Heller, Aneel K. Aggarwal, David J.E. Callaway, and Zimei Bu. 2015. "Phosphatidylinositol 4,5-  
2047 Bisphosphate Clusters the Cell Adhesion Molecule CD44 and Assembles a Specific CD44-Ezrin  
2048 Heterocomplex, as Revealed by Small Angle Neutron Scattering." *Journal of Biological Chemistry* 290 (10):  
2049 6639–52. doi:10.1074/jbc.M114.589523.
- 2050 61. Cherfils, Jacqueline, and Mahel Zeghouf. 2013. "Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs."  
2051 *Physiological Reviews* 93 (1): 269–309. doi:10.1152/physrev.00003.2012.
- 2052 62. Chesarone, Melissa a, Amy Grace DuPage, and Bruce L Goode. 2010. "Unleashing Formins to Remodel the  
2053 Actin and Microtubule Cytoskeletons." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (1). Nature Publishing  
2054 Group: 62–74. doi:10.1038/nrm2816.
- 2055 63. Chircop, Megan. 2014. "Rho GTPases as Regulators of Mitosis and Cytokinesis in Mammalian Cells." *Small*  
2056 *GTPases* 5 (July). Landes Bioscience: e29770. doi:10.4161/sgtp.29770.
- 2057 64. Chirivino, D, L Del Maestro, E Formstecher, P Hupe, G Raposo, D Louvard, and M Arpin. 2011. "The ERM  
2058 Proteins Interact with the HOPS Complex to Regulate the Maturation of Endosomes." *Mol Biol Cell* 22 (3):  
2059 375–85. doi:10.1091/mbc.E10-09-0796.

- 2060 65. Christoforidis, Savvas, Marta Miaczynska, Keith Ashman, Matthias Wilm, Liyun Zhao, S C Yip, Michael D.  
2061 Waterfield, Jonathan M. Backer, and Marino Zerial. 1999. "Phosphatidylinositol-3-OH Kinases Are Rab5  
2062 Effectors." *Nature Cell Biology* 1 (4): 249–52. doi:10.1038/12075.
- 2063 66. Chung, Kyoung-Jin, Ioannis Mitroulis, Johannes R Wiessner, Ying Yi Zheng, Gabriele Siegert, Markus  
2064 Sperandio, and Triantafyllos Chavakis. 2014. "A Novel Pathway of Rapid TLR-Triggered Activation of  
2065 Integrin-Dependent Leukocyte Adhesion That Requires Rap1 GTPase." *Molecular Biology of the Cell* 25 (19).  
2066 American Society for Cell Biology: 2948–55. doi:10.1091/mbc.E14-04-0867.
- 2067 67. Clarke, Margaret, Annette Müller-Taubenberger, Kurt I Anderson, Ulrike Engel, and Günther Gerisch. 2006.  
2068 "Mechanically Induced Actin-Mediated Rocketing of Phagosomes." *Molecular Biology of the Cell* 17 (11):  
2069 4866–75. doi:10.1091/mbc.E06-04-0365.
- 2070 68. Clerc, P, and P J Sansonetti. 1987. "Entry of Shigella Flexneri into HeLa Cells: Evidence for Directed  
2071 Phagocytosis Involving Actin Polymerization and Myosin Accumulation." *Infection and Immunity* 55 (11):  
2072 2681–88.
- 2073 69. Clucas, Jarama, and Ferran Valderrama. 2014. "ERM Proteins in Cancer Progression." *Journal of Cell Science*  
2074 127 (2): 267–75. doi:10.1242/jcs.133108.
- 2075 70. Coleman, Sherry A, Elizabeth R Fischer, Dale Howe, David J Mead, and Robert A Heinzen. 2004. "Temporal  
2076 Analysis of Coxiella Burnetii Morphological Differentiation." *Journal of Bacteriology* 186 (21): 7344–52.  
2077 doi:10.1128/JB.186.21.7344-7352.2004.
- 2078 71. Colonne, Punsiri M, Caylin G Winchell, Joseph G Graham, Frances I Onyilagha, Laura J MacDonald, Heike  
2079 R Doeppler, Peter Storz, y col. 2016. "Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein Activity Is Required for  
2080 Coxiella Burnetii Growth in Human Macrophages." *PLOS Pathogens* 12 (10). Public Library of Science:  
2081 e1005915.
- 2082 72. Confer, Anthony W, and Sahlu Ayalew. 2013. "The OmpA Family of Proteins: Roles in Bacterial  
2083 Pathogenesis and Immunity." *Veterinary Microbiology* 163 (3–4). Netherlands: 207–22.  
2084 doi:10.1016/j.vetmic.2012.08.019.
- 2085 73. Conti, Filippo, Nicolas Boucherit, Veronica Baldassarre, Virginie Trouplin, Rudolf Toman, Giovanna  
2086 Mottola, Jean-Louis Mege, and Eric Ghigo. 2014. "Coxiella Burnetii Lipopolysaccharide Blocks p38 $\alpha$ -MAPK  
2087 Activation through the Disruption of TLR-2 and TLR-4 Association." *Frontiers in Cellular and Infection*  
2088 *Microbiology* 4. Frontiers Media SA: 182. doi:10.3389/fcimb.2014.00182.
- 2089 74. Conti, Mary Anne, Sachiyo Kawamoto, and Robert S Adelstein. 2008. "Non-Muscle Myosin II." In *Myosins*,  
2090 223–64. Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-1-4020-6519-4\_7.
- 2091 75. Cossart, P, M F Vicente, J Mengaud, F Baquero, J C Perez-Diaz, and P Berche. 1989. "Listeriolysin O Is  
2092 Essential for Virulence of Listeria Monocytogenes: Direct Evidence Obtained by Gene Complementation."  
2093 *Infection and Immunity* 57 (11): 3629–36.
- 2094 76. Crane, Jonathan M, and Lukas K Tamm. 2004. "Role of Cholesterol in the Formation and Nature of Lipid  
2095 Rafts in Planar and Spherical Model Membranes." *Biophysical Journal* 86 (5). Biophysical Society: 2965–79.
- 2096 77. Croisé, Pauline, Catherine Estay-Ahumada, Stéphane Gasman, and Stéphane Ory. 2014. "Rho GTPases,  
2097 Phosphoinositides, and Actin." *Small GTPases* 5 (2): e29469. doi:10.4161/sgtp.29469.
- 2098 78. D'Costa, Vanessa M., Virginie Braun, Marija Landekic, Rong Shi, Ariane Proteau, Laura McDonald,  
2099 Mirosław Cygler, Sergio Grinstein, and John H. Brummell. 2015. "Salmonella Disrupts Host Endocytic



2100 Trafficking by SopD2-Mediated Inhibition of Rab7.” *Cell Reports* 12 (9). The Authors: 1508–18.  
2101 doi:10.1016/j.celrep.2015.07.063.

2102 79. Dai, J, H P Ting-Beall, and M P Sheetz. 1997. “The Secretion-Coupled Endocytosis Correlates with  
2103 Membrane Tension Changes in RBL 2H3 Cells.” *The Journal of General Physiology* 110 (1). United States: 1–  
2104 10.

2105 80. Dai, Shipan, Patrick D. Sarmiere, O. Wiggan, James R. Bamburg, and Daoguo Zhou. 2004. “Efficient  
2106 Salmonella Entry Requires Activity Cycles of Host ADF and Cofilin.” *Cellular Microbiology* 6 (5): 459–71.  
2107 doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00375.x.

2108 81. Dan, C, A Kelly, O Bernard, and A Minden. 2001. “Cytoskeletal Changes Regulated by the PAK4  
2109 Serine/threonine Kinase Are Mediated by LIM Kinase 1 and Cofilin.” *The Journal of Biological Chemistry* 276  
2110 (34). United States: 32115–21. doi:10.1074/jbc.M100871200.

2111 82. Davidson, Andrew J., and Will Wood. 2016. “Unravelling the Actin Cytoskeleton: A New Competitive  
2112 Edge?” *Trends in Cell Biology* 26 (8). Elsevier Ltd: 569–76. doi:10.1016/j.tcb.2016.04.001.

2113 83. de Curtis, I., and J. Meldolesi. 2012. “Cell Surface Dynamics - How Rho GTPases Orchestrate the Interplay  
2114 between the Plasma Membrane and the Cortical Cytoskeleton.” *Journal of Cell Science* 125 (19). The  
2115 Company of Biologists Ltd: 4435–44. doi:10.1242/jcs.108266.

2116 84. de Oliveira, Carlos A., and Bernardo Mantovani. 1988. “Latrunculin A Is a Potent Inhibitor of Phagocytosis  
2117 by Macrophages.” *Life Sciences* 43 (22). Pergamon: 1825–30. doi:10.1016/0024-3205(88)90282-2.

2118 85. de Souza, Wanderley, Celso Sant’Anna, and Narcisa L. Cunha-e-Silva. 2009. “Electron Microscopy and  
2119 Cytochemistry Analysis of the Endocytic Pathway of Pathogenic Protozoa.” *Progress in Histochemistry and*  
2120 *Cytochemistry* 44 (2): 67–124. doi:10.1016/j.proghi.2009.01.001.

2121 86. Defacque, Hélène, Evelyne Bos, Boyan Garvalov, Cécile Barret, Christian Roy, Paul Mangeat, Hye-Won Shin,  
2122 Vladimir Rybin, and Gareth Griffiths. 2002. “Phosphoinositides Regulate Membrane-Dependent Actin  
2123 Assembly by Latex Bead Phagosomes.” *Molecular Biology of the Cell* 13 (4). United States: 1190–1202.  
2124 doi:10.1091/mbc.01-06-0314.

2125 87. Defacque, Hélène, Morten Egeberg, Anja Habermann, Maria Diakonova, Christian Roy, Paul Mangeat,  
2126 Wolfgang Voelter, y col. 2000. “Involvement of Ezrin/moesin in de Novo Actin Assembly on Phagosomal  
2127 Membranes.” *The EMBO Journal* 19 (2). EMBO Press: 199–212. doi:10.1093/emboj/19.2.199.

2128 88. Deinhardt, Katrin, Otto Berninghausen, Hugh J. Willison, Colin R. Hopkins, and Giampietro Schiavo. 2006.  
2129 “Tetanus Toxin Is Internalized by a Sequential Clathrin-Dependent Mechanism Initiated within Lipid  
2130 Microdomains and Independent of epsin1.” *The Journal of Cell Biology* 174 (3): 459–71.  
2131 doi:10.1083/jcb.200508170.

2132 89. Dellacasagrande, J., E. Ghigo, S M Hammami, R. Toman, D. Raoult, C. Capo, and J. L. Mege. 2000.  
2133 “alpha(v)beta(3) Integrin and Bacterial Lipopolysaccharide Are Involved in Coxiella Burnetii-Stimulated  
2134 Production of Tumor Necrosis Factor by Human Monocytes.” *Infection and Immunity* 68 (10): 5673–78.  
2135 doi:10.1128/IAI.68.10.5673-5678.2000.

2136 90. Deng, Shishan, and Cai Huang. 2014. “E3 Ubiquitin Ligases in Regulating Stress Fiber, Lamellipodium, and  
2137 Focal Adhesion Dynamics.” *Cell Adhesion & Migration* 8 (1). Landes Bioscience: 49–54.  
2138 doi:10.4161/cam.27480.

- 2139 91. DerMardirossian, C., G. Rocklin, J.-Y. Seo, and G. M. Bokoch. 2006. "Phosphorylation of RhoGDI by Src  
2140 Regulates Rho GTPase Binding and Cytosol-Membrane Cycling." *Molecular Biology of the Cell* 17 (11):  
2141 4760–68. doi:10.1091/mbc.E06-06-0533.
- 2142 92. DerMardirossian, Céline, and Gary M. Bokoch. 2005. "GDIs: Central Regulatory Molecules in Rho GTPase  
2143 Activation." *Trends in Cell Biology* 15 (7): 356–63. doi:10.1016/j.tcb.2005.05.001.
- 2144 93. Diakonova, Maria, Gary Bokoch, and Joel A. Swanson. 2002. "Dynamics of Cytoskeletal Proteins during  
2145 Fcγ Receptor-Mediated Phagocytosis in Macrophages." *Molecular Biology of the Cell* 13 (2). American  
2146 Society for Cell Biology: 402–11. doi:10.1091/mbc.01-05-0273.
- 2147 94. Di Pietro, Caterina, Ping-xia Zhang, Timothy K. O'Rourke, Thomas S. Murray, Lin Wang, Clemente J. Britto,  
2148 Jonathan L. Koff, Diane S. Krause, Marie E. Egan, and Emanuela M. Bruscia. 2017. "Ezrin Links CFTR to  
2149 TLR4 Signaling to Orchestrate Anti-Bacterial Immune Response in Macrophages." *Scientific Reports* 7 (1):  
2150 10882. doi:10.1038/s41598-017-11012-7.
- 2151 95. Dominguez, Roberto. 2004. "Actin-Binding Proteins – a Unifying Hypothesis." *Trends in Biochemical  
2152 Sciences* 29 (11). Elsevier: 572–78. doi:10.1016/j.tibs.2004.09.004.
- 2153 96. Dominguez, Roberto, and Kenneth C. Holmes. 2011. "Actin Structure and Function." *Annual Review of  
2154 Biophysics* 40 (1): 169–86. doi:10.1146/annurev-biophys-042910-155359.
- 2155 97. Doulet, Nicolas, Emmanuel Donnadieu, Marie-Pierre Laran-Chich, Florence Niedergang, Xavier Nassif,  
2156 Pierre Olivier Couraud, and Sandrine Bourdoulous. 2006. "Neisseria Meningitidis Infection of Human  
2157 Endothelial Cells Interferes with Leukocyte Transmigration by Preventing the Formation of Endothelial  
2158 Docking Structures." *The Journal of Cell Biology* 173 (4): 627–37. doi:10.1083/jcb.200507128.
- 2159 98. Dransart, Estelle, Annie Morin, Jacqueline Cherfils, and Birgitta Olofsson. 2005. "Uncoupling of Inhibitory  
2160 and Shuttling Functions of Rho GDP Dissociation Inhibitors." *Journal of Biological Chemistry* 280 (6): 4674–  
2161 83. doi:10.1074/jbc.M409741200.
- 2162 99. Dulyaninova, Natalya G., and Anne R. Bresnick. 2013. "The Heavy Chain Has Its Day: Regulation of Myosin-  
2163 II Assembly." *Bioarchitecture* 3 (4): 77–85. doi:10.4161/bioa.26133.
- 2164 100. Dzwonek, Joanna, and Grzegorz M. Wilczynski. 2015. "CD44: Molecular Interactions, Signaling and  
2165 Functions in the Nervous System." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9 (May): 1–9.  
2166 doi:10.3389/fncel.2015.00175.
- 2167 101. Edwards, D C, L C Sanders, G M Bokoch, and G N Gill. 1999. "Activation of LIM-Kinase by Pak1 Couples  
2168 Rac/Cdc42 GTPase Signalling to Actin Cytoskeletal Dynamics." *Nature Cell Biology* 1 (5). England: 253–59.  
2169 doi:10.1038/12963.
- 2170 102. Edwards, Marc, Adam Zwolak, Dorothy A Schafer, David Sept, Roberto Dominguez, and John A Cooper.  
2171 2014. "Capping Protein Regulators Fine-Tune Actin Assembly Dynamics." *Nature Reviews. Molecular Cell  
2172 Biology* 15 (10): 677–89. doi:10.1038/nrm3869.
- 2173 103. El-Sayed, Ayman, and Hideyoshi Harashima. 2013. "Endocytosis of Gene Delivery Vectors: From Clathrin-  
2174 Dependent to Lipid Raft-Mediated Endocytosis." *Molecular Therapy* 21 (6): 1118–30.  
2175 doi:10.1038/mt.2013.54.
- 2176 104. Ellerbroek, Shawn M, Krister Wennerberg, and Keith Burridge. 2003. "Serine Phosphorylation Negatively  
2177 Regulates RhoA in Vivo." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (21). United States: 19023–31.  
2178 doi:10.1074/jbc.M213066200.

- 2179 105. Elzinga, M, J H Collins, W M Kuehl, and R S Adelstein. 1973. "Complete Amino-Acid Sequence of Actin of  
2180 Rabbit Skeletal Muscle." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70  
2181 (9). United States: 2687–91.
- 2182 106. Erwig, L.-P., K. A. McPhilips, M. W. Wynes, A. Ivetic, A. J. Ridley, and P. M. Henson. 2006. "Differential  
2183 Regulation of Phagosome Maturation in Macrophages and Dendritic Cells Mediated by Rho GTPases and  
2184 Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (34): 12825–  
2185 30. doi:10.1073/pnas.0605331103.
- 2186 107. Eugène, Emmanuel, Isabelle Hoffmann, Céline Pujol, Pierre-olivier Couraud, Sandrine Bourdoulous, and  
2187 Xavier Nassif. 2002. "Microvilli-like Structures Are Associated with the Internalization of Virulent  
2188 Capsulated Neisseria Meningitidis into Vascular Endothelial Cells." *Journal of Cell Science* 115 (Pt 6): 1231–  
2189 41.
- 2190 108. Fairn, Gregory D., and Sergio Grinstein. 2012. "How Nascent Phagosomes Mature to Become  
2191 Phagolysosomes." *Trends in Immunology* 33 (8). Elsevier Current Trends: 397–405.  
2192 doi:10.1016/j.it.2012.03.003.
- 2193 109. Falcone, Sestina, Emanuele Cocucci, Paola Podini, Tomas Kirchhausen, Emilio Clementi, and Jacopo  
2194 Meldolesi. 2006. "Macropinocytosis: Regulated Coordination of Endocytic and Exocytic Membrane Traffic  
2195 Events." *Journal of Cell Science* 119 (Pt 22). England: 4758–69. doi:10.1242/jcs.03238.
- 2196 110. Fehon, Richard G., Andrea I. McClatchey, and Anthony Bretscher. 2010. "Organizing the Cell Cortex: The  
2197 Role of ERM Proteins." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (4): 276–87. doi:10.1038/nrm2866.
- 2198 111. Feng, J, M Ito, Y Kureishi, K Ichikawa, M Amano, N Isaka, K Okawa, y col. 1999. "Rho-Associated Kinase of  
2199 Chicken Gizzard Smooth Muscle." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (6). United States: 3744–52.
- 2200 112. Fernandes, Talita D., Larissa D. Cunha, Juliana M. Ribeiro, Liliana M. Massis, Djalma S. Lima-Junior, Hayley  
2201 J. Newton, and Dario S. Zamboni. 2016. "Murine Alveolar Macrophages Are Highly Susceptible to  
2202 Replication of Coxiella Burnetii Phase II In Vitro." *Infection and Immunity* 84 (9): 2439–48.  
2203 doi:10.1128/IAI.00411-16.
- 2204 113. Fields, Kenneth A., and Ted Hackstadt. 2002. "The Chlamydial Inclusion: Escape from the Endocytic  
2205 Pathway." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18 (1): 221–45.  
2206 doi:10.1146/annurev.cellbio.18.012502.105845.
- 2207 114. Fiévet, Bruno, Daniel Louvard, and Monique Arpin. 2007. "ERM Proteins in Epithelial Cell Organization and  
2208 Functions." *Biochimica et Biophysica Acta* 1773 (5): 653–60. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.06.013.
- 2209 115. Fievet, Bruno T, Alexis Gautreau, Christian Roy, Laurence Del Maestro, Paul Mangeat, Daniel Louvard, and  
2210 Monique Arpin. 2004. "Phosphoinositide Binding and Phosphorylation Act Sequentially in the Activation  
2211 Mechanism of Ezrin." *The Journal of Cell Biology* 164 (5): 653–59. doi:10.1083/jcb.200307032.
- 2212 116. Figueroa, Cindy M, Moraima Morales-Cruz, Bethzaida N Suárez, Jean C Fernández, Anna M Molina,  
2213 Carmen M Quiñones, and Kai Griebenow. 2015. "Induction of Cancer Cell Death by Hyaluronic Acid-  
2214 Mediated Uptake of Cytochrome C." *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology* 6 (5): 316.  
2215 doi:10.4172/2157-7439.1000316.
- 2216 117. Firat-karalar, Elif Nur, and Matthew D Welch. 2012. "NIH Public Access" 23 (1): 4–13.  
2217 doi:10.1016/j.ceb.2010.10.007.

- 2218 118. Flannagan, Ronald S., Valentin Jaumouillé, and Sergio Grinstein. 2012. "The Cell Biology of Phagocytosis."  
2219 *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 7 (1): 61–98. doi:10.1146/annurev-pathol-011811-  
2220 132445.
- 2221 119. Flannagan, Ronald S, Rene E Harrison, Christopher M Yip, Khuloud Jaqaman, and Sergio Grinstein. 2010.  
2222 "Dynamic Macrophage 'probing' Is Required for the Efficient Capture of Phagocytic Targets." *The Journal of*  
2223 *Cell Biology* 191 (6). The Rockefeller University Press: 1205–18. doi:10.1083/jcb.201007056.
- 2224 120. Forget, Marie-Annick, Richard R Desrosiers, Denis Gingras, and Richard Beliveau. 2002. "Phosphorylation  
2225 States of Cdc42 and RhoA Regulate Their Interactions with Rho GDP Dissociation Inhibitor and Their  
2226 Extraction from Biological Membranes." *The Biochemical Journal* 361 (Pt 2). England: 243–54.
- 2227 121. Fournier, P E, T J Marrie, and D Raoult. 1998. "Diagnosis of Q Fever." *Journal of Clinical Microbiology* 36  
2228 (7). American Society for Microbiology (ASM): 1823–34.
- 2229 122. Fratti, R. A., J. Chua, I. Vergne, and V. Deretic. 2003. "Mycobacterium Tuberculosis Glycosylated  
2230 Phosphatidylinositol Causes Phagosome Maturation Arrest." *Proceedings of the National Academy of*  
2231 *Sciences* 100 (9): 5437–42. doi:10.1073/pnas.0737613100.
- 2232 123. Fratti, Rutilio A., Jonathan M. Backer, Jean Gruenberg, Silvia Corvera, and Vojo Deretic. 2001. "Role of  
2233 Phosphatidylinositol 3-Kinase and Rab5 Effectors in Phagosomal Biogenesis and Mycobacterial Phagosome  
2234 Maturation Arrest." *The Journal of Cell Biology* 154 (3): 631–44. doi:10.1083/jcb.200106049.
- 2235 124. Fujii, T, A H Iwane, T Yanagida, and K Namba. 2010. "Direct Visualization of Secondary Structures of F-  
2236 Actin by Electron Cryomicroscopy." *Nature* 467 (7316). Nature Publishing Group: 724–28.  
2237 doi:10.1038/nature09372.
- 2238 125. Fujimoto, L M, R Roth, J E Heuser, and S L Schmid. 2000. "Actin Assembly Plays a Variable, but Not  
2239 Obligatory Role in Receptor-Mediated Endocytosis in Mammalian Cells." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 1  
2240 (2): 161–71.
- 2241 126. Fujisaki, Takeshi, Yoshiya Tanaka, Koichi Fujii, Shinichiro Mine, Kazuyoshi Saito, Shinwa Yamada, Uki  
2242 Yamashita, Tatsuro Irimura, and Sumiya Eto. 1999. "CD44 Stimulation Induces Integrin-Mediated Adhesion  
2243 of Colon Cancer Cell Lines to Endothelial Cells by Up-Regulation of Integrins and c-Met and Activation of  
2244 Integrins 1." *CANCER RESEARCH* 59: 4427–34.
- 2245 127. Garcia-Mata, Rafael, Etienne Boulter, and Keith Burridge. 2011. "The 'Invisible Hand': Regulation of RHO  
2246 GTPases by RHOGDIs." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (8). Nature Publishing Group: 493–504.  
2247 doi:10.1038/nrm3153.
- 2248 128. Garza-Mayers, Anna Cristina, Kelly A Miller, Brian C Russo, Dipal V Nagda, and Marcia B Goldberg. 2015.  
2249 "Shigella Flexneri Regulation of ARF6 Activation during Bacterial Entry via an IpgD-Mediated Positive  
2250 Feedback Loop." *mBio* 6 (2). American Society for Microbiology (ASM): e02584. doi:10.1128/mBio.02584-  
2251 14.
- 2252 129. Gatfield, J, and J Pieters. 2000. "Essential Role for Cholesterol in Entry of Mycobacteria into Macrophages."  
2253 *Science (New York, N.Y.)* 288 (5471). United States: 1647–50.
- 2254 130. Gautreau, Alexis, Daniel Louvard, and Monique Arpin. 2000. "Morphogenic Effects of Ezrin Require a  
2255 Phosphorylation-Induced Transition from Oligomers to Monomers at the Plasma Membrane." *Journal of*  
2256 *Cell Biology* 150 (1): 193–203. doi:10.1083/jcb.150.1.193.

- 2257 131. Gelfand, Vladimir I, and Alexander D Bershadsky. 1991. "Microtubule Dynamics: Mechanism, Regulation,  
2258 and Function." *Annual Review of Cell Biology* 7 (1). Annual Reviews: 93–116.  
2259 doi:10.1146/annurev.cb.07.110191.000521.
- 2260 132. Ghigo, Eric, Christian Capo, Ching-Hsuan Tung, Didier Raoult, Jean-Pierre Gorvel, and Jean-Louis Mege.  
2261 2002. "Coxiella Burnetii Survival in THP-1 Monocytes Involves the Impairment of Phagosome Maturation:  
2262 IFN-Gamma Mediates Its Restoration and Bacterial Killing." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*  
2263 169 (8). United States: 4488–95.
- 2264 133. Gilk, Stacey D. 2012. "Role of Lipids in Coxiella Burnetii Infection." In *Advances in Experimental Medicine*  
2265 *and Biology*, 984:199–213. doi:10.1007/978-94-007-4315-1\_10.
- 2266 134. Gilk, Stacey D., Diane C. Cockrell, Courtney Luterbach, Bryan Hansen, Leigh A. Knodler, J. Antonio Ibarra,  
2267 Olivia Steele-Mortimer, and Robert A. Heinzen. 2013. "Bacterial Colonization of Host Cells in the Absence of  
2268 Cholesterol." Edited by L. David Sibley. *PLoS Pathogens* 9 (1). Public Library of Science: e1003107.  
2269 doi:10.1371/journal.ppat.1003107.
- 2270 135. Gorvel, J P, P Chavrier, M Zerial, and J Gruenberg. 1991. "rab5 Controls Early Endosome Fusion in Vitro."  
2271 *Cell* 64 (5): 915–25.
- 2272 136. Grant, Barth D, and Julie G Donaldson. 2009. "Pathways and Mechanisms of Endocytic Recycling." *Nature*  
2273 *Reviews Molecular Cell Biology* 10 (9). NIH Public Access: 597–608. doi:10.1038/nrm2755.
- 2274 137. Grassart, Alexandre, Aaron T Cheng, Sun Hae Hong, Fan Zhang, Nathan Zenzer, Yongmei Feng, David M  
2275 Briner, Gregory D Davis, Dmitry Malkov, and David G Drubin. 2014. "Actin and dynamin2 Dynamics and  
2276 Interplay during Clathrin-Mediated Endocytosis." *The Journal of Cell Biology* 205 (5). Rockefeller University  
2277 Press: 721–35. doi:10.1083/jcb.201403041.
- 2278 138. Green, Erin R, and Joan Mecsas. 2016. "Bacterial Secretion Systems: An Overview." In *Virulence Mechanisms*  
2279 *of Bacterial Pathogens, Fifth Edition*, 4:215–39. American Society of Microbiology.  
2280 doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015.
- 2281 139. Griffiths, Gareth, and Luis Mayorga. 2007. "Phagosome Proteomes Open the Way to a Better Understanding  
2282 of Phagosome Function." *Genome Biology* 8 (3): 207. doi:10.1186/gb-2007-8-3-207.
- 2283 140. Gu, Ben J., Bernadette M. Saunders, Claudia Jursik, and James S. Wiley. 2010. "The P2X7-Nonmuscle  
2284 Myosin Membrane Complex Regulates Phagocytosis of Nonopsonized Particles and Bacteria by a Pathway  
2285 Attenuated by Extracellular ATP." *Blood* 115 (8): 1621–31. doi:10.1182/blood-2009-11-251744.
- 2286 141. Gu, Zhizhan, Erika H. Noss, Victor W. Hsu, and Michael B. Brenner. 2011. "Integrins Traffic Rapidly via  
2287 Circular Dorsal Ruffles and Macropinocytosis during Stimulated Cell Migration." *Journal of Cell Biology* 193  
2288 (1): 61–70. doi:10.1083/jcb.201007003.
- 2289 142. Guilluy, Christophe, Malvyne Rolli-Derkinderen, Laurent Loufrani, Anne Bourge, Daniel Henrion, Luc  
2290 Sabourin, Gervaise Loirand, and Pierre Pacaud. 2008. "Ste20-Related Kinase SLK Phosphorylates Ser188 of  
2291 RhoA to Induce Vasodilation in Response to Angiotensin II Type 2 Receptor Activation." *Circulation*  
2292 *Research* 102 (10). United States: 1265–74. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.164764.
- 2293 143. Gürtler, Lutz, Ursula Bauerfeind, Johannes Blümel, Reinhard Burger, Christian Drost, Albrecht Gröner,  
2294 Margarethe Heiden, y col. 2014. "Coxiella Burnetii - Pathogenic Agent of Q (Query) Fever." *Transfusion*  
2295 *Medicine and Hemotherapy* 41 (1). Karger Publishers: 2–2. doi:10.1159/000357107.

- 2296 144. Gutierrez, Maximiliano G., Cristina L. Vázquez, Daniela B. Munafó, Felipe C. M. Zoppino, Walter Berón,  
2297 Michel Rabinovitch, and María I. Colombo. 2005. "Autophagy Induction Favours the Generation and  
2298 Maturation of the Coxiella-Replicative Vacuoles." *Cellular Microbiology* 7 (7): 981–93. doi:10.1111/j.1462-  
2299 5822.2005.00527.x.
- 2300 145. Hamada, Keisuke, Toshiyuki Shimizu, Takeshi Matsui, Shoichiro Tsukita, Sachiko Tsukita, and Toshio  
2301 Hakoshima. 2000. "Structural Basis of the Membrane-targeting and Unmasking Mechanisms of the Radixin  
2302 FERM Domain." *The EMBO Journal* 19 (17): 4449 LP-4462.  
2303 <http://emboj.embopress.org/content/19/17/4449.abstract>.
- 2304 146. Hänisch, Jan, Robert Kölm, Milena Wozniczka, Dirk Bumann, Klemens Rottner, Theresia E.B. B Stradal, Jan  
2305 Hänisch, y col. 2011. "Activation of a RhoA/Myosin II-Dependent but Arp2/3 Complex-Independent  
2306 Pathway Facilitates Salmonella Invasion." *Cell Host & Microbe* 9 (4). United States: 273–85.  
2307 doi:10.1016/j.chom.2011.03.009.
- 2308 147. Hansen, Carsten G, and Benjamin J Nichols. 2009. "Molecular Mechanisms of Clathrin-Independent  
2309 Endocytosis." *Journal of Cell Science* 122 (Pt 11). Company of Biologists: 1713–21. doi:10.1242/jcs.033951.
- 2310 148. Harris, R J, P A Storm, A Lloyd, M Arens, and B P Marmion. 2000. "Long-Term Persistence of Coxiella  
2311 Burnetii in the Host after Primary Q Fever." *Epidemiology and Infection* 124 (3): 543–49.
- 2312 149. Hart, Simon P., Adriano G. Rossi, Christopher Haslett, and Ian Dransfield. 2012. "Characterization of the  
2313 Effects of Cross-Linking of Macrophage CD44 Associated with Increased Phagocytosis of Apoptotic PMN."  
2314 *PLoS ONE* 7 (3). doi:10.1371/journal.pone.0033142.
- 2315 150. Hartmann, Svenja, Anne J. Ridley, and Susanne Lutz. 2015. "The Function of Rho-Associated Kinases  
2316 ROCK1 and ROCK2 in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease." *Frontiers in Pharmacology* 6 (NOV): 1–  
2317 16. doi:10.3389/fphar.2015.00276.
- 2318 151. Heinzen, R A, M A Scidmore, D D Rockey, and T Hackstadt. 1996. "Differential Interaction with Endocytic  
2319 and Exocytic Pathways Distinguish Parasitophorous Vacuoles of Coxiella Burnetii and Chlamydia  
2320 Trachomatis." *Infection and Immunity* 64 (3): 796–809.
- 2321 152. Heiska, L, K Alfthan, M Grönholm, P Vilja, A Vaheri, and O Carpén. 1998. "Association of Ezrin with  
2322 Intercellular Adhesion Molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by Phosphatidylinositol 4, 5-  
2323 Bisphosphate." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (34): 21893–900.
- 2324 153. Herman, I M. 1993. "Actin Isoforms." *Current Opinion in Cell Biology* 5 (1). England: 48–55.
- 2325 154. Hernandez, Lorraine D, Karsten Hueffer, Markus R Wenk, and Jorge E Galan. 2004. "Salmonella Modulates  
2326 Vesicular Traffic by Altering Phosphoinositide Metabolism." *Science (New York, N.Y.)* 304 (5678). United  
2327 States: 1805–7. doi:10.1126/science.1098188.
- 2328 155. Herrmann, Harald, Harald Bar, Laurent Kreplak, Sergei V Strelkov, and Ueli Aebi. 2007. "Intermediate  
2329 Filaments: From Cell Architecture to Nanomechanics." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (7).  
2330 England: 562–73. doi:10.1038/nrm2197.
- 2331 156. High, N, J Mounier, M C Prévost, and P J Sansonetti. 1992. "IpaB of Shigella Flexneri Causes Entry into  
2332 Epithelial Cells and Escape from the Phagocytic Vacuole." *The EMBO Journal* 11 (5). European Molecular  
2333 Biology Organization: 1991–99.

- 2334 157. Hill, Michelle M., Michele Bastiani, Robert Luetterforst, Matthew Kirkham, Annika Kirkham, Susan J. Nixon,  
2335 Piers Walser, y col. 2008. "PTRF-Cavin, a Conserved Cytoplasmic Protein Required for Caveola Formation  
2336 and Function." *Cell* 132 (1): 113–24. doi:10.1016/j.cell.2007.11.042.
- 2337 158. Hirao, M, N Sato, T Kondo, S Yonemura, M Monden, T Sasaki, Y Takai, S Tsukita, and S Tsukita. 1996.  
2338 "Regulation Mechanism of ERM (Ezrin/radixin/moesin) Protein/plasma Membrane Association: Possible  
2339 Involvement of Phosphatidylinositol Turnover and Rho-Dependent Signaling Pathway." *The Journal of Cell*  
2340 *Biology* 135 (1): 37–51.
- 2341 159. Hishiya, A, M Ohnishi, S Tamura, and F Nakamura. 1999. "Protein Phosphatase 2C Inactivates F-Actin  
2342 Binding of Human Platelet Moesin." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (38). United States: 26705–12.
- 2343 160. Hoover, T A, D W Culp, M H Vodkin, J C Williams, and H A Thompson. 2002. "Chromosomal DNA  
2344 Deletions Explain Phenotypic Characteristics of Two Antigenic Variants, Phase II and RSA 514 (Crazy), of  
2345 the Coxiella Burnetii Nine Mile Strain." *Infection and Immunity* 70 (12): 6726–33.
- 2346 161. Howard, J, A J Hudspeth, and R D Vale. 1989. "Movement of Microtubules by Single Kinesin Molecules."  
2347 *Nature* 342 (6246). England: 154–58. doi:10.1038/342154a0.
- 2348 162. Howe, Dale, and Robert A. Heinzen. 2006. "Coxiella Burnetii Inhabits a Cholesterol-Rich Vacuole and  
2349 Influences Cellular Cholesterol Metabolism." *Cellular Microbiology* 8 (3). Blackwell Science Ltd: 496–507.  
2350 doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00641.x.
- 2351 163. Howe, Dale, Jana Melnicakova, Imrich Barak, and Robert A Heinzen. 2003. "Maturation of the Coxiella  
2352 Burnetii Parasitophorous Vacuole Requires Bacterial Protein Synthesis but Not Replication." *Cellular*  
2353 *Microbiology* 5 (7). England: 469–80.
- 2354 164. Howe, Dale, Jeffrey G. Shannon, Seth Winfree, David W. Dorward, and Robert A. Heinzen. 2010. "Coxiella  
2355 Burnetii Phase I and II Variants Replicate with Similar Kinetics in Degradative Phagolysosome-like  
2356 Compartments of Human Macrophages." *Infection and Immunity* 78 (8): 3465–74. doi:10.1128/IAI.00406-  
2357 10.
- 2358 165. Howe, D, and L P Mallavia. 2000. "Coxiella Burnetii Exhibits Morphological Change and Delays  
2359 Phagolysosomal Fusion after Internalization by J774A.1 Cells." *Infection and Immunity* 68 (7). American  
2360 Society for Microbiology (ASM): 3815–21.
- 2361 166. Huotari, Jatta, and Ari Helenius. 2011. "Endosome Maturation." *The EMBO Journal* 30 (17). European  
2362 Molecular Biology Organization: 3481–3500. doi:10.1038/emboj.2011.286.
- 2363 167. Huynh, Cassidy K, Eeva-Liisa Eskelinen, Cameron C Scott, Anatoly Malevanets, Paul Saftig, and Sergio  
2364 Grinstein. 2007. "LAMP Proteins Are Required for Fusion of Lysosomes with Phagosomes." *The EMBO*  
2365 *Journal* 26 (2). European Molecular Biology Organization: 313–24. doi:10.1038/sj.emboj.7601511.
- 2366 168. Hyman, A A, and T J Mitchison. 1991. "Two Different Microtubule-Based Motor Activities with Opposite  
2367 Polarities in Kinetochores." *Nature* 351 (6323). England: 206–11. doi:10.1038/351206a0.
- 2368 169. Ishikawa, H, R Bischoff, and H Holtzer. 1968. "Mitosis and Intermediate-Sized Filaments in Developing  
2369 Skeletal Muscle." *The Journal of Cell Biology* 38 (3). United States: 538–55.
- 2370 170. Ishizaki, T, M Maekawa, K Fujisawa, K Okawa, A Iwamatsu, A Fujita, N Watanabe, y col. 1996. "The Small  
2371 GTP-Binding Protein Rho Binds to and Activates a 160 kDa Ser/Thr Protein Kinase Homologous to  
2372 Myotonic Dystrophy Kinase." *The EMBO Journal* 15 (8). England: 1885–93.

- 2373 171. Ishizaki, T, M Uehata, I Tamechika, J Keel, K Nonomura, M Maekawa, and S Narumiya. 2000.  
2374 "Pharmacological Properties of Y-27632, a Specific Inhibitor of Rho-Associated Kinases." *Molecular*  
2375 *Pharmacology* 57 (5). United States: 976–83.
- 2376 172. Itoh, Toshiki, and Junya Hasegawa. 2013. "Mechanistic Insights into the Regulation of Circular Dorsal Ruffle  
2377 Formation." *Journal of Biochemistry* 153 (1): 21–29. doi:10.1093/jb/mvs138.
- 2378 173. Jajou, Rana, Cornelia Christina Henrica Wielders, Monique Leclercq, Jeroen van Leuken, Shahan Shamelian,  
2379 Nicole Renders, Wim van der Hoek, and Peter Schneeberger. 2014. "Persistent High Antibody Titres against  
2380 Coxiella Burnetii after Acute Q Fever Not Explained by Continued Exposure to the Source of Infection: A  
2381 Case-Control Study." *BMC Infectious Diseases* 14 (1): 629. doi:10.1186/s12879-014-0629-6.
- 2382 174. Jégou, Antoine, Thomas Niedermayer, József Orbán, Dominique Didry, Reinhard Lipowsky, Marie-France  
2383 Carlier, and Guillaume Romet-Lemonne. 2011. "Individual Actin Filaments in a Microfluidic Flow Reveal  
2384 the Mechanism of ATP Hydrolysis and Give Insight Into the Properties of Profilin." Edited by Thomas  
2385 Pollard. *PLoS Biology* 9 (9): e1001161. doi:10.1371/journal.pbio.1001161.
- 2386 175. Jiang, Hong, Richard S Peterson, Weihua Wang, Eckart Bartnik, Cheryl B Knudson, and Warren Knudson.  
2387 2002. "A Requirement for the CD44 Cytoplasmic Domain for Hyaluronan Binding, Pericellular Matrix  
2388 Assembly, and Receptor-Mediated Endocytosis in COS-7 Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 277  
2389 (12). United States: 10531–38. doi:10.1074/jbc.M108654200.
- 2390 176. Johansson, Marie, Nuno Rocha, Wilbert Zwart, Ingrid Jordens, Lennert Janssen, Coenraad Kuijl, Vesa M  
2391 Olkkonen, and Jacques Neefjes. 2007. "Activation of Endosomal Dynein Motors by Stepwise Assembly of  
2392 Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the Receptor BetalIII Spectrin." *The Journal of Cell Biology* 176 (4). The  
2393 Rockefeller University Press: 459–71. doi:10.1083/jcb.200606077.
- 2394 177. Jung, C, A Matzke, H H Niemann, Christian Schwerk, Tobias Tenenbaum, and V Orian-Rousseau. 2009.  
2395 "Involvement of CD44v6 in InlB-Dependent Listeria Invasion." *Molecular Microbiology* 72 (5): 1196–1207.  
2396 doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06716.x.
- 2397 178. Kabsch, Wolfgang, Hans Georg Mannherz, Dietrich Suck, Emil F Pai, and Kenneth C Holmes. 1990. "Atomic  
2398 Structure of the Actin: DNase I Complex ." *Nature* 347 (6288): 37–44.
- 2399 179. Kanellos, Georgios, and Margaret C. Frame. 2016. "Cellular Functions of the ADF/cofilin Family at a  
2400 Glance." *Journal of Cell Science* 129 (17): 3211–18. doi:10.1242/jcs.187849.
- 2401 180. Kaplan, G. 1977. "Differences in the Mode of Phagocytosis with Fc and C3 Receptors in Macrophages."  
2402 *Scandinavian Journal of Immunology* 6 (8): 797–807.
- 2403 181. Kimura, K, M Ito, M Amano, K Chihara, Y Fukata, M Nakafuku, B Yamamori, y col. 1996. "Regulation of  
2404 Myosin Phosphatase by Rho and Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase)." *Science (New York, N.Y.)* 273  
2405 (5272). United States: 245–48.
- 2406 182. Kinchen, Jason M, and Kodi S Ravichandran. 2010. "Identification of Two Evolutionarily Conserved Genes  
2407 Regulating Processing of Engulfed Apoptotic Cells." *Nature* 464 (7289): 778–82. doi:10.1038/nature08853.
- 2408 183. Kjekken, Rune, Morten Egeberg, Anja Habermann, Mark Kuehnel, Pascale Peyron, Matthias Floetenmeyer,  
2409 Paul Walther, y col. 2004. "Fusion between Phagosomes, Early and Late Endosomes: A Role for Actin in  
2410 Fusion between Late, but Not Early Endocytic Organelles." *Molecular Biology of the Cell* 15 (1): 345–58.  
2411 doi:10.1091/mbc.E03-05-0334.



- 2412 184. Klemm, P, and M A Schembri. 2000. "Bacterial Adhesins: Function and Structure." *International Journal of*  
2413 *Medical Microbiology : IJMM* 290 (1). Germany: 27–35. doi:10.1016/S1438-4221(00)80102-2.
- 2414 185. Kobayashi, Toshihide, M H Beuchat, Margaret Lindsay, Sonia Frias, Richard D. Palmiter, Hitoshi Sakuraba,  
2415 Robert G. Parton, and Jean Gruenberg. 1999. "Late Endosomal Membranes Rich in Lysobisphosphatidic  
2416 Acid Regulate Cholesterol Transport." *Nature Cell Biology* 1 (2): 113–18. doi:10.1038/10084.
- 2417 186. Korn, E D, M F Carlier, and D Pantaloni. 1987. "Actin Polymerization and ATP Hydrolysis." *Science (New*  
2418 *York, N.Y.)* 238 (4827): 638–44.
- 2419 187. Korotkova, Natalia, Yuliya Yarova-Yarovaya, Veronika Tchesnokova, Nina Yazvenko, Mike A Carl, Ann E  
2420 Stapleton, and Steve L Moseley. 2008. "Escherichia Coli DraE Adhesin-Associated Bacterial Internalization  
2421 by Epithelial Cells Is Promoted Independently by Decay-Accelerating Factor and Carcinoembryonic  
2422 Antigen-Related Cell Adhesion Molecule Binding and Does Not Require the DraD Invasin." *Infection and*  
2423 *Immunity* 76 (9). American Society for Microbiology: 3869–80. doi:10.1128/IAI.00427-08.
- 2424 188. Kovács, Mihály, Judit Tóth, Csaba Hetényi, András Málnási-Csizmadia, and James R Sellers. 2004.  
2425 "Mechanism of Blebbistatin Inhibition of Myosin II." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (34). American  
2426 Society for Biochemistry and Molecular Biology: 35557–63. doi:10.1074/jbc.M405319200.
- 2427 189. Kruth, Howard S, Nancy L Jones, Wei Huang, Bin Zhao, Itsuko Ishii, Janet Chang, Christian A Combs,  
2428 Daniela Malide, and Wei-Yang Zhang. 2005. "Macropinocytosis Is the Endocytic Pathway That Mediates  
2429 Macrophage Foam Cell Formation with Native Low Density Lipoprotein." *The Journal of Biological*  
2430 *Chemistry* 280 (3). United States: 2352–60. doi:10.1074/jbc.M407167200.
- 2431 190. Krzyzaniak, Magdalena Anna, Michael Thomas Zumstein, Juan Atilio Gerez, Paola Picotti, and Ari Helenius.  
2432 2013. "Host Cell Entry of Respiratory Syncytial Virus Involves Macropinocytosis Followed by Proteolytic  
2433 Activation of the F Protein." *PLoS Pathogens* 9 (4). United States: e1003309.  
2434 doi:10.1371/journal.ppat.1003309.
- 2435 191. Kudryashov, Dmitri S., and Emil Reisler. 2013. "ATP and ADP Actin States." *Biopolymers* 99 (4): 245–56.  
2436 doi:10.1002/bip.22155.
- 2437 192. Kühn, Sonja, and Hans Georg Mannherz. 2017. "Actin: Structure, Function, Dynamics, and Interactions with  
2438 Bacterial Toxins." In *Curr Top Microbiol Immunol.*, 399:1–34. doi:10.1007/82\_2016\_45.
- 2439 193. Kurokawa, Kazuo, Reina E Itoh, Hisayoshi Yoshizaki, Yusuke Ohba Takeshi Nakamura, and Michiyuki  
2440 Matsuda. 2004. "Coactivation of Rac1 and Cdc42 at Lamellipodia and Membrane Ruffles Induced by  
2441 Epidermal Growth Factor." *Molecular Biology of the Cell* 15 (3): 1003–10. doi:10.1091/mbc.E03-08-0609.
- 2442 194. Kwok, Terry, Steffen Backert, Heinz Schwarz, Jurgen Berger, and Thomas F Meyer. 2002. "Specific Entry of  
2443 Helicobacter Pylori into Cultured Gastric Epithelial Cells via a Zipper-like Mechanism." *Infection and*  
2444 *Immunity* 70 (4). United States: 2108–20.
- 2445 195. Kwon, T, D Y Kwon, J Chun, J H Kim, and S S Kang. 2000. "Akt Protein Kinase Inhibits Rac1-GTP Binding  
2446 through Phosphorylation at Serine 71 of Rac1." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (1). United States:  
2447 423–28.
- 2448 196. Lafont, Frank, Guy Tran Van Nhieu, Kentaro Hanada, Philippe Sansonetti, and F Gisou van der Goot. 2002.  
2449 "Initial Steps of Shigella Infection Depend on the Cholesterol/sphingolipid Raft-Mediated CD44-IpaB  
2450 Interaction." *The EMBO Journal* 21 (17). England: 4449–57.

- 2451 197. Lamaze, C, L M Fujimoto, H L Yin, and S L Schmid. 1997. "The Actin Cytoskeleton Is Required for  
2452 Receptor-Mediated Endocytosis in Mammalian Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (33).  
2453 American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 20332–35. doi:10.1074/JBC.272.33.20332.
- 2454 198. Lankes, W T, and H Furthmayr. 1991. "Moesin: A Member of the Protein 4.1-Talin-Ezrin Family of  
2455 Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (19). United  
2456 States: 8297–8301.
- 2457 199. Larson, Charles L, Paul A Beare, Dale Howe, and Robert A Heinzen. 2013. "Coxiella Burnetii Effector Protein  
2458 Subverts Clathrin-Mediated Vesicular Trafficking for Pathogen Vacuole Biogenesis." *Proceedings of the  
2459 National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (49). National Academy of Sciences:  
2460 E4770–79. doi:10.1073/pnas.1309195110.
- 2461 200. Larson, Charles L, Paul A Beare, Daniel E Voth, Dale Howe, Diane C Cockrell, Robert J Bastidas, Raphael H  
2462 Valdivia, and Robert A Heinzen. 2015. "Coxiella Burnetii Effector Proteins That Localize to the  
2463 Parasitophorous Vacuole Membrane Promote Intracellular Replication." Edited by C R Roy. *Infection and  
2464 Immunity* 83 (2). 1752 N St., N.W., Washington, DC: American Society for Microbiology: 661–70.  
2465 doi:10.1128/IAI.02763-14.
- 2466 201. Le Cabec, Véronique, Sébastien Carréno, André Moisand, Christine Bordier, and Isabelle Maridonneau-  
2467 Parini. 2002. "Complement Receptor 3 (CD11b/CD18) Mediates Type I and Type II Phagocytosis during  
2468 Nonopsonic and Opsonic Phagocytosis, Respectively." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169  
2469 (4): 2003–9.
- 2470 202. Lee, C.-Y., Marc Herant, and Volkmar Heinrich. 2011. "Target-Specific Mechanics of Phagocytosis:  
2471 Protrusive Neutrophil Response to Zymosan Differs from the Uptake of Antibody-Tagged Pathogens."  
2472 *Journal of Cell Science* 124 (7): 1106–14. doi:10.1242/jcs.078592.
- 2473 203. Lee, Eunkyung, and David A Knecht. 2002. "Visualization of Actin Dynamics during Macropinocytosis and  
2474 Exocytosis." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 3 (3). England: 186–92.
- 2475 204. Lee, J.-L., M.-J. Wang, P.-R. Sudhir, and J.-Y. Chen. 2008. "CD44 Engagement Promotes Matrix-Derived  
2476 Survival through the CD44-SRC-Integrin Axis in Lipid Rafts." *Molecular and Cellular Biology* 28 (18).  
2477 American Society for Microbiology (ASM): 5710–23. doi:10.1128/MCB.00186-08.
- 2478 205. Leemans, Jaklien C., Sandrine Florquin, Mirjam Heikens, Steven T. Pals, Ronald Van der Neut, and Tom Van  
2479 der Poll. 2003. "CD44 Is a Macrophage Binding Site for Mycobacterium Tuberculosis That Mediates  
2480 Macrophage Recruitment and Protective Immunity against Tuberculosis." *Journal of Clinical Investigation*  
2481 111 (5): 681–89. doi:10.1172/JCI200316936.
- 2482 206. Legg, James W., and Clare M. Isacke. 1998. "Identification and Functional Analysis of the Ezrin-Binding Site  
2483 in the Hyaluronan Receptor, CD44." *Current Biology : CB* 8 (12): 705–8. doi:10.1016/S0960-9822(98)70277-  
2484 5.
- 2485 207. Legg, John A, Guillaume Bompard, John Dawson, Hannah L Morris, Natalie Andrew, Lisa Cooper, Simon A  
2486 Johnston, Giorgos Tramountanis, and Laura M Machesky. 2007. "N-WASP Involvement in Dorsal Ruffle  
2487 Formation in Mouse Embryonic Fibroblasts." *Molecular Biology of the Cell* 18 (2): 678–87.  
2488 doi:10.1091/mbc.E06-06-0569.
- 2489 208. Lehmann, Maik J, Nathan M Sherer, Carolyn B Marks, Marc Pypaert, and Walther Mothes. 2005. "Actin-  
2490 and Myosin-Driven Movement of Viruses along Filopodia Precedes Their Entry into Cells." *The Journal of  
2491 Cell Biology* 170 (2). United States: 317–25. doi:10.1083/jcb.200503059.

- 2492 209. Li, Cao, Yuqing Wu, Andrea Riehle, Véronique Orian-Rousseau, Yang Zhang, Erich Gulbins, and Heike  
2493 Grassmé. 2017. "Regulation of Staphylococcus Aureus Infection of Macrophages by CD44, Reactive Oxygen  
2494 Species, and Acid Sphingomyelinase." *Antioxidants & Redox Signaling*, no. November (August).  
2495 doi:10.1089/ars.2017.6994.
- 2496 210. Liu, Allen P., François Aguet, Gaudenz Danuser, and Sandra L. Schmid. 2010. "Local Clustering of  
2497 Transferrin Receptors Promotes Clathrin-Coated Pit Initiation." *The Journal of Cell Biology* 191 (7).
- 2498 211. Liu, Hongjie, Zhaoting Wu, Xianle Shi, Wenzhi Li, Chang Liu, Dekun Wang, Xiaoying Ye, y col. 2013.  
2499 "Atypical PKC, Regulated by Rho GTPases and Mek/Erk, Phosphorylates Ezrin during Eight-Cell  
2500 Embryocompaction." *Developmental Biology* 375 (1): 13–22.
- 2501 212. Lodish, Harvey, Arnold Berk, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Anthony Bretscher, Hidde Ploegh, Angelika  
2502 Amon, and Kelsey C. Martin. 2016. *Molecular Cell Biology*. Edited by Erica Champion and Heather Moffat.  
2503 8th ed. New York: Freeman, W.H.
- 2504 213. Lukáčová, Magdalena, Ján Kazár, Eva Gajdošová, and Miriam Vavreková. 1993. "Phase Variation of  
2505 Lipopolysaccharide of Coxiella Burnetii, Strain Priscilla during Chick Embryo Yolk Sac Passaging." *FEMS*  
2506 *Microbiology Letters* 113 (3): 285–89.
- 2507 214. Luo, Lin, Adam A. Wall, Jeremy C. Yeo, Nicholas D. Condon, Suzanne J. Norwood, Simone Schoenwaelder,  
2508 Kaiwen W. Chen, y col. 2014. "Rab8a Interacts Directly with PI3Kγ to Modulate TLR4-Driven PI3K and  
2509 mTOR Signalling." *Nature Communications* 5 (July): 4407. doi:10.1038/ncomms5407.
- 2510 215. MacDonald, Laura J, Richard C Kurten, and Daniel E Voth. 2012. "Coxiella Burnetii Alters Cyclic AMP-  
2511 Dependent Protein Kinase Signaling during Growth in Macrophages." Edited by F. C. Fang. *Infection and*  
2512 *Immunity* 80 (6). American Society for Microbiology (ASM): 1980–86. doi:10.1128/IAI.00101-12.
- 2513 216. Mahawar, Manish, Maninjay K Atianand, Rachel J Dotson, Vanessa Mora, Seham M Rabadi, Dennis W  
2514 Metzger, Jason F Huntley, Jonathan A Harton, Meenakshi Malik, and Chandra Shekhar Bakshi. 2012.  
2515 "Identification of a Novel Francisella Tularensis Factor Required for Intramacrophage Survival and  
2516 Subversion of Innate Immune Response." *Journal of Biological Chemistry* 287 (30). United States: 25216–29.  
2517 doi:10.1074/jbc.M112.367672.
- 2518 217. Manetti, Fabrizio. 2012. "LIM Kinases Are Attractive Targets with Many Macromolecular Partners and Only  
2519 a Few Small Molecule Regulators." *Medicinal Research Reviews* 32 (5): 968–98. doi:10.1002/med.20230.
- 2520 218. M Olazabal, Isabel, Emmanuelle Caron, Robin May, Kerstin Schilling, David Knecht, and Laura Machesky.  
2521 2002. *Rho-Kinase and Myosin-II Control Phagocytic Cup Formation during CR, but Not FcγR, Phagocytosis*.  
2522 *Current Biology : CB*. Vol. 12. doi:10.1016/S0960-9822(02)01069-2.
- 2523 219. Marion, Sabrina, Eik Hoffmann, Daniela Holzer, Christophe Le Clainche, Marianne Martin, Martin Sachse,  
2524 Iva Ganeva, Paul Mangeat, and Gareth Griffiths. 2011. "Ezrin Promotes Actin Assembly at the Phagosome  
2525 Membrane and Regulates Phago-Lysosomal Fusion." *Traffic* 12 (4): 421–37. doi:10.1111/j.1600-  
2526 0854.2011.01158.x.
- 2527 220. Marmion, B.P., O. Sukocheva, P.A. Storm, M. Lockhart, M. Turra, T. Kok, J. Ayres, H. Routledge, and S.  
2528 Graves. 2009. "Q Fever: Persistence of Antigenic Non-Viable Cell Residues of Coxiella Burnetii in the Host--  
2529 Implications for Post Q Fever Infection Fatigue Syndrome and Other Chronic Sequelae." *QJM* 102 (10).  
2530 Oxford University Press: 673–84. doi:10.1093/qjmed/hcp077.

- 2531 221. Marmion, B P, P A Storm, J G Ayres, L. Semendric, L. Mathews, W. Winslow, M. Turra, and R J Harris. 2005.  
 2532 “Long-Term Persistence of Coxiella Burnetii after Acute Primary Q Fever.” *QJM : Monthly Journal of the*  
 2533 *Association of Physicians* 98 (1): 7–20. doi:10.1093/qjmed/hci009.
- 2534 222. Martinelli, Sibylla, Emily J H Chen, Fiona Clarke, Ruth Lyck, Sarah Affentranger, Janis K Burkhardt, and  
 2535 Verena Niggli. 2013. “Ezrin/Radixin/Moesin Proteins and Flotillins Cooperate to Promote Uropod  
 2536 Formation in T Cells.” *Frontiers in Immunology* 4. Frontiers Media SA: 84. doi:10.3389/fimmu.2013.00084.
- 2537 223. Martinez, Eric, Franck Cantet, Laura Fava, Isobel Norville, and Matteo Bonazzi. 2014. “Identification of  
 2538 OmpA, a Coxiella Burnetii Protein Involved in Host Cell Invasion, by Multi-Phenotypic High-Content  
 2539 Screening.” Edited by Raphael H. Valdivia. *PLoS Pathogens* 10 (3). Public Library of Science: e1004013.  
 2540 doi:10.1371/journal.ppat.1004013.
- 2541 224. Masters, Thomas a, Bruno Pontes, Virgile Viasnoff, You Li, and Nils C Gauthier. 2013. “Plasma Membrane  
 2542 Tension Orchestrates Membrane Trafficking, Cytoskeletal Remodeling, and Biochemical Signaling during  
 2543 Phagocytosis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (29):  
 2544 11875–80. doi:10.1073/pnas.1301766110.
- 2545 225. Maurin, M, and D Raoult. 1999. “Q Fever.” *Clinical Microbiology Reviews* 12 (4): 518–53.
- 2546 226. McBride, H M, V Rybin, C Murphy, A Giner, R Teasdale, and M Zerial. 1999. “Oligomeric Complexes Link  
 2547 Rab5 Effectors with NSF and Drive Membrane Fusion via Interactions between EEA1 and Syntaxin 13.” *Cell*  
 2548 98 (3): 377–86.
- 2549 227. McDonough, Justin A., Hayley J. Newton, Scott Klum, Rachel Swiss, Hervé Agaisse, and Craig R. Roy. 2013.  
 2550 “Host Pathways Important for Coxiella Burnetii Infection Revealed by Genome-Wide RNA Interference  
 2551 Screening.” *mBio* 4 (1): e00606-12. doi:10.1128/mBio.00606-12.
- 2552 228. McDonough, Justin A., Hayley J. Newton, and Craig R. Roy. 2012. “Coxiella Burnetii Secretion Systems.”  
 2553 *Advances in Experimental Medicine and Biology* 984: 171–97. doi:10.1007/978-94-007-4315-1\_9.
- 2554 229. McMahon, Harvey T., and Emmanuel Boucrot. 2011. “Molecular Mechanism and Physiological Functions of  
 2555 Clathrin-Mediated Endocytosis.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (8). Nature Publishing Group:  
 2556 517–33. doi:10.1038/nrm3151.
- 2557 230. MECONI, S., C. CAPO, M. REMACLE-BONNET, G. POMMIER, D. RAOULT, and J.-L. MEGE. 2001.  
 2558 “Activation of Protein Tyrosine Kinases by Coxiella Burnetii: Role in Actin Cytoskeleton Reorganization and  
 2559 Bacterial Phagocytosis.” *Infection and ...* 69 (4): 2520–26. doi:10.1128/IAI.69.4.2520.
- 2560 231. Mellor, Liliana, Cheryl B. Knudson, Daisuke Hida, Emily B. Askew, and Warren Knudson. 2013.  
 2561 “Intracellular Domain Fragment of CD44 Alters CD44 Function in Chondrocytes.” *Journal of Biological*  
 2562 *Chemistry* 288 (36): 25838–50. doi:10.1074/jbc.M113.494872.
- 2563 232. Mengaud, J, H Ohayon, P Gounon, Mege R-M, and P Cossart. 1996. “E-Cadherin Is the Receptor for  
 2564 Internalin, a Surface Protein Required for Entry of L. Monocytogenes into Epithelial Cells.” *Cell* 84 (6): 923–  
 2565 32.
- 2566 233. Méresse, S, K E Unsworth, A Habermann, G Griffiths, F Fang, M J Martínez-Lorenzo, S R Waterman, J P  
 2567 Gorvel, and D W Holden. 2001. “Remodelling of the Actin Cytoskeleton Is Essential for Replication of  
 2568 Intravacuolar Salmonella.” *Cellular Microbiology* 3 (8): 567–77. doi:10.1016/j.chom.2008.05.018.

- 2569 234. Miao, Edward A, Mitchell Brittnacher, Andrea Haraga, Robert L Jeng, Matthew D Welch, and Samuel I  
2570 Miller. 2003. "Salmonella Effectors Translocated across the Vacuolar Membrane Interact with the Actin  
2571 Cytoskeleton." *Molecular Microbiology* 48 (2). England: 401–15.
- 2572 235. Michaelson, David, Joseph Silletti, Gretchen Murphy, Peter D'Eustachio, Mark Rush, and Mark R. Philips.  
2573 2001. "Differential Localization of Rho GTPases in Live Cells: Regulation by Hypervariable Regions and  
2574 RhoGDI Binding." *Journal of Cell Biology* 152 (1): 111–26. doi:10.1083/jcb.152.1.111.
- 2575 236. Millar, Jess A, Paul A Beare, Abraham S Moses, Craig A Martens, Robert A Heinzen, and Rahul Raghavan.  
2576 2017. "Whole-Genome Sequence of *Coxiella Burnetii* Nine Mile RSA439 (Phase II, Clone 4), a Laboratory  
2577 Workhorse Strain." *Genome Announcements* 5 (23). American Society for Microbiology: 23–24.  
2578 doi:10.1128/genomeA.00471-17.
- 2579 237. Mizuno, K, I Okano, Kazumasa Ohashi, K Nunoue, K.-I Kuma, T Miyata, and T Nakamura. 1994.  
2580 *Identification of a Human cDNA Encoding a Novel Protein Kinase with Two Repeats of the LIM/double Zinc*  
2581 *Finger Motif. Oncogene*. Vol. 9.
- 2582 238. Moos, A, and T Hackstadt. 1987. "Comparative Virulence of Intra- and Interstrain Lipopolysaccharide  
2583 Variants of *Coxiella Burnetii* in the Guinea Pig Model." *Infection and Immunity* 55 (5): 1144–50.
- 2584 239. Morgan-Fisher, Marie, Ulla M Wewer, and Atsuko Yoneda. 2013. "Regulation of ROCK Activity in Cancer."  
2585 *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society* 61 (3). United  
2586 States: 185–98. doi:10.1369/0022155412470834.
- 2587 240. Morris, R E, A S Gerstein, P F Bonventre, and C B Saelinger. 1985. "Receptor-Mediated Entry of Diphtheria  
2588 Toxin into Monkey Kidney (Vero) Cells: Electron Microscopic Evaluation." *Infection and Immunity* 50 (3):  
2589 721–27.
- 2590 241. Morroy, Gabriëlla, Wim van der Hoek, Jelle Albers, Roel A. Coutinho, Chantal P. Bleeker-Rovers, and Peter  
2591 M. Schneeberger. 2015. "Population Screening for Chronic Q-Fever Seven Years after a Major Outbreak."  
2592 Edited by James E Samuel. *PLOS ONE* 10 (7). Public Library of Science: e0131777.  
2593 doi:10.1371/journal.pone.0131777.
- 2594 242. Mulye, Minal, Dhritiman Samanta, Seth Winfree, Robert A. Heinzen, and Stacey D. Gilk. 2017. "Elevated  
2595 Cholesterol in the *Coxiella Burnetii* Intracellular Niche Is Bacteriolytic." Edited by Barbara Burleigh. *mBio* 8  
2596 (1): e02313-16. doi:10.1128/mBio.02313-16.
- 2597 243. Murai, Toshiyuki. 2015. "Lipid Raft-Mediated Regulation of Hyaluronan–CD44 Interactions in  
2598 Inflammation and Cancer." *Frontiers in Immunology* 6 (August). Frontiers Media S.A.: 420.  
2599 doi:10.3389/fimmu.2015.00420.
- 2600 244. Murali, Arun, and Krishnaraj Rajalingam. 2014. "Small Rho GTPases in the Control of Cell Shape and  
2601 Mobility." *Cellular and Molecular Life Sciences* 71 (9): 1703–21. doi:10.1007/s00018-013-1519-6.
- 2602 245. Murray, James T, Christina Panaretou, Harald Stenmark, Marta Miaczynska, and Jonathan M Backer. 2002.  
2603 "Role of Rab5 in the Recruitment of hVps34/p150 to the Early Endosome." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 3  
2604 (6): 416–27.
- 2605 246. Nakamura, Nao, Noriko Oshiro, Yuko Fukata, Mutsuki Amano, Masaki Fukata, Shinya Kuroda, Yoshiharu  
2606 Matsuura, Thomas Leung, Louis Lim, and Kozo Kaibuchi. 2000. "Phosphorylation of ERM Proteins at  
2607 Filopodia Induced by Cdc42." *Genes to Cells* 5 (7). Blackwell Science Ltd: 571–81. doi:10.1046/j.1365-  
2608 2443.2000.00348.x.

- 2609 247. Namba, A, N Mano, H Takano, T Beppu, K Ueda, and H Hirose. 2008. "OmpA Is an Adhesion Factor of  
2610 *Aeromonas Veronii*, an Optimistic Pathogen That Habituates in Carp Intestinal Tract." *Journal of Applied*  
2611 *Microbiology* 105 (5). England: 1441–51. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03883.x.
- 2612 248. Newton, Hayley J, Justin A McDonough, and Craig R Roy. 2013. "Effector Protein Translocation by the  
2613 *Coxiella Burnetii* Dot/Icm Type IV Secretion System Requires Endocytic Maturation of the Pathogen-  
2614 Occupied Vacuole." Edited by Yousef Abu Kwaik. *PLoS ONE* 8 (1). Public Library of Science: e54566.  
2615 doi:10.1371/journal.pone.0054566.
- 2616 249. Niedergang, F, and P Chavrier. 2005. "Regulation of Phagocytosis by Rho GTPases." In *Bacterial Virulence*  
2617 *Factors and Rho GTPases*, edited by Patrice Boquet and Emmanuel Lemichez, 43–60. Berlin, Heidelberg:  
2618 Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/3-540-27511-8\_4.
- 2619 250. Nishioka, Tomoki, Masanori Nakayama, Mutsuki Amano, and Kozo Kaibuchi. 2012. "Proteomic Screening  
2620 for Rho-Kinase Substrates by Combining Kinase and Phosphatase Inhibitors with 14-3-3 $\zeta$  Affinity  
2621 Chromatography." *Cell Structure and Function* 37: 39–48. doi:10.1247/csf.11044.
- 2622 251. Nobes, Catherine D, and Alan Hall. 1995. "Rho, Rac, and Cdc42 GTPases Regulate the Assembly of  
2623 Multimolecular Focal Complexes Associated with Actin Stress Fibers, Lamellipodia, and Filopodia." *Cell* 81  
2624 (1): 53–62. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(95)90370-4.
- 2625 252. Nogales, E. 2001. "Structural Insight into Microtubule Function." *Annual Review of Biophysics and*  
2626 *Biomolecular Structure* 30. United States: 397–420. doi:10.1146/annurev.biophys.30.1.397.
- 2627 253. Nordmann, Mirjana, Margarita Cabrera, Angela Perz, Cornelia Brocker, Clemens Ostrowicz, Siegfried  
2628 Engelbrecht-Vandre, and Christian Ungermann. 2010. "The Mon1-Ccz1 Complex Is the GEF of the Late  
2629 Endosomal Rab7 Homolog Ypt7." *Current Biology : CB* 20 (18). England: 1654–59.  
2630 doi:10.1016/j.cub.2010.08.002.
- 2631 254. Oberoi, Tripat Kaur, Taner Dogan, Jennifer C Hocking, Rolf-Peter Scholz, Juliane Mooz, Carrie L Anderson,  
2632 Christiaan Karreman, y col. 2012. "IAPs Regulate the Plasticity of Cell Migration by Directly Targeting Rac1  
2633 for Degradation." *The EMBO Journal* 31 (1). England: 14–28. doi:10.1038/emboj.2011.423.
- 2634 255. Oda, Toshiro, Mitsusada Iwasa, Tomoki Aihara, Yuichiro Maéda, and Akihiro Narita. 2009. "The Nature of  
2635 the Globular- to Fibrous-Actin Transition." *Nature* 457 (7228): 441–45. doi:10.1038/nature07685.
- 2636 256. Okano, I, J Hiraoka, H Otera, K Nunoue, K Ohashi, S Iwashita, M Hirai, and K Mizuno. 1995. "Identification  
2637 and Characterization of a Novel Family of Serine/threonine Kinases Containing Two N-Terminal LIM  
2638 Motifs." *The Journal of Biological Chemistry* 270 (52). United States: 31321–30.
- 2639 257. Olazabal, Isabel M, Emmanuelle Caron, Robin C May, Kerstin Schilling, David A Knecht, Laura M  
2640 Machesky, Isabel M Olazabal, y col. 2002. "Rho-Kinase and Myosin-II Control Phagocytic Cup Formation  
2641 during CR, but Not Fc $\gamma$ gammaR, Phagocytosis." *Current Biology : CB* 12 (16): 1413–18. doi:10.1016/S0960-  
2642 9822(02)01069-2.
- 2643 258. Oliferenko, Snezhana, Karin Paiha, Thomas Harder, Volker Gerke, Christoph Schwärzler, Heinz Schwarz,  
2644 Hartmut Beug, Ursula Günthert, and Lukas A Huber. 1999. "Analysis of Cd44-Containing Lipid Rafts:  
2645 Recruitment of Annexin II and Stabilization by the Actin Cytoskeleton." *The Journal of Cell Biology* 146 (4).  
2646 The Rockefeller University Press: 843–54.
- 2647 259. Omsland, Anders, Paul A Beare, Joshua Hill, Diane C Cockrell, Dale Howe, Bryan Hansen, James E Samuel,  
2648 and Robert A Heinzen. 2011. "Isolation from Animal Tissue and Genetic Transformation of *Coxiella*  
2649 *Burnetii* Are Facilitated by an Improved Axenic Growth Medium." *Applied and Environmental Microbiology*

2650 77 (11). 1752 N St., N.W., Washington, DC: American Society for Microbiology: 3720–25.  
2651 doi:10.1128/AEM.02826-10.

2652 260. Omsland, Anders, Diane C Cockrell, Dale Howe, Elizabeth R Fischer, Kimmo Virtaneva, Daniel E  
2653 Sturdevant, Stephen F Porcella, and Robert A Heinzen. 2009. “Host Cell-Free Growth of the Q Fever  
2654 Bacterium *Coxiella Burnetii*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*  
2655 106 (11). United States: 4430–34. doi:10.1073/pnas.0812074106.

2656 261. Oshiro, N, Y Fukata, and K Kaibuchi. 1998. “Phosphorylation of Moesin by Rho-Associated Kinase (Rho-  
2657 Kinase) Plays a Crucial Role in the Formation of Microvilli-like Structures.” *The Journal of Biological*  
2658 *Chemistry* 273 (52). United States: 34663–66.

2659 262. Ouasti, Sihem, Paul J. Kingham, Giorgio Terenghi, and Nicola Tirelli. 2012. “The CD44/integrins Interplay  
2660 and the Significance of Receptor Binding and Re-Presentation in the Uptake of RGD-Functionalized  
2661 Hyaluronic Acid.” *Biomaterials* 33 (4). Elsevier Ltd: 1120–34. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.10.009.

2662 263. Pacheco, Richard C, Ignacio E Echaide, Rosiane N Alves, Marcelo E Beletti, Santiago Nava, and Marcelo B  
2663 Labruna. 2013. “*Coxiella Burnetii* in Ticks, Argentina.” *Emerging Infectious Diseases* 19 (2). Centers for  
2664 Disease Control and Prevention: 344–46. doi:10.3201/eid1902.120362.

2665 264. Page, A L, H Ohayon, P J Sansonetti, and C Parsot. 1999. “The Secreted IpaB and IpaC Invasins and Their  
2666 Cytoplasmic Chaperone IpgC Are Required for Intercellular Dissemination of *Shigella Flexneri*.” *Cellular*  
2667 *Microbiology* 1 (2): 183–93.

2668 265. Palumbo, R Noelle, and Chun Wang. 2006. “Bacterial Invasin: Structure, Function, and Implication for  
2669 Targeted Oral Gene Delivery.” *Current Drug Delivery* 3 (1). United Arab Emirates: 47–53.

2670 266. Parton, Robert G., and Kai Simons. 2007. “The Multiple Faces of Caveolae.” *Nature Reviews Molecular Cell*  
2671 *Biology* 8 (3): 185–94. doi:10.1038/nrm2122.

2672 267. Patel, Prerna C., and Rene E. Harrison. 2008. “Membrane Ruffles Capture C3bi-Opsonized Particles in  
2673 Activated Macrophages.” *Molecular Biology of the Cell* 19 (11). American Society for Cell Biology: 4628–39.  
2674 doi:10.1091/mbc.E08-02-0223.

2675 268. Pearson, Matthew A, David Reczek, Anthony Bretscher, and P A Karplus. 2000. “Structure of the ERM  
2676 Protein Moesin Reveals the FERM Domain Fold Masked by an Extended Actin Binding Tail Domain.” *Cell*  
2677 101 (3). Elsevier: 259–70. doi:10.1016/S0092-8674(00)80836-3.

2678 269. Pepe, J C, and V L Miller. 1993. “*Yersinia Enterocolitica* Invasin: A Primary Role in the Initiation of  
2679 Infection.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (14): 6473–77.

2680 270. Perschl, A, J Lesley, N English, I Trowbridge, and R Hyman. 1995. “Role of CD44 Cytoplasmic Domain in  
2681 Hyaluronan Binding.” *European Journal of Immunology* 25 (2). United States: 495–501.  
2682 doi:10.1002/eji.1830250228.

2683 271. Picaud, Laetitia, Benoît Thibault, Eliane Mery, Monia Ouali, Alejandra Martinez, Jean-Pierre Delord, Bettina  
2684 Couderc, and Gwenael Ferron. 2014. *Evaluation of the Effects of Hyaluronic Acid-Carboxymethyl Cellulose*  
2685 *Barrier on Ovarian Tumor Progression. Journal of Ovarian Research*. Vol. 7. doi:10.1186/1757-2215-7-40.

2686 272. Picking, Wendy L, Hiroaki Nishioka, Patricia D Hearn, M Aaron Baxter, Amanda T Harrington, Ariel  
2687 Blocker, and William D Picking. 2005. “IpaD of *Shigella Flexneri* Is Independently Required for Regulation  
2688 of Ipa Protein Secretion and Efficient Insertion of IpaB and IpaC into Host Membranes.” *Infection and*  
2689 *Immunity* 73 (3). American Society for Microbiology (ASM): 1432–40. doi:10.1128/IAI.73.3.1432-1440.2005.

- 2690 273. Pizarro-Cerdá, Javier, Alain Charbit, Jost Enninga, Frank Lafont, and Pascale Cossart. 2016. "Manipulation  
2691 of Host Membranes by the Bacterial Pathogens *Listeria*, *Francisella*, *Shigella* and *Yersinia*." *Seminars in Cell  
2692 & Developmental Biology* 60 (Supplement C): 155–67. doi:<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.07.019>.
- 2693 274. Pizarro-Cerdá, Javier, Pascale Cossart, P. Sebbel, G. Min, T.A. Neubert, R. Glockshuber, X.R. Wu, y col. 2006.  
2694 "Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells." *Cell* 124 (4). Elsevier: 715–27. doi:[10.1016/j.cell.2006.02.012](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.012).
- 2695 275. Pollard, Thomas D. 2016. "Actin and Actin-Binding Proteins." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8  
2696 (8): a018226. doi:[10.1101/cshperspect.a018226](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018226).
- 2697 276. Pols, Maaike S., and Judith Klumperman. 2009. "Trafficking and Function of the Tetraspanin CD63."  
2698 *Experimental Cell Research* 315 (9). Academic Press: 1584–92. doi:[10.1016/j.yexcr.2008.09.020](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.09.020).
- 2699 277. Ponuwei, Godwin A. 2016. "A Glimpse of the ERM Proteins." *Journal of Biomedical Science* 23 (1). Journal of  
2700 Biomedical Science: 35. doi:[10.1186/s12929-016-0246-3](https://doi.org/10.1186/s12929-016-0246-3).
- 2701 278. Pore, Debasis, and Neetu Gupta. 2015. "Ezrin-Radixin-Moesin Family Proteins in the Regulation of B Cell  
2702 Immune Response." *Critical Reviews in Immunology* 35 (1): 15–31.
- 2703 279. Poteryaev, Dmitry, Sunando Datta, Karin Ackema, Marino Zerial, and Anne Spang. 2010. "Identification of  
2704 the Switch in Early-to-Late Endosome Transition." *Cell* 141 (3): 497–508. doi:[10.1016/j.cell.2010.03.011](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.011).
- 2705 280. Pouillet, Patrick, Alexis Gautreau, Gress Kadaré, Jean-Antoine Girault, Daniel Louvard, and Monique Arpin.  
2706 2001. "Ezrin Interacts with Focal Adhesion Kinase and Induces Its Activation Independently of Cell-Matrix  
2707 Adhesion." *Journal of Biological Chemistry* 276 (40): 37686–91. doi:[10.1074/jbc.M106175200](https://doi.org/10.1074/jbc.M106175200).
- 2708 281. Prag, Soren, Maddy Parsons, Melanie D Keppler, Simon M Ameer-Beg, Paul Barber, James Hunt, Andrew J  
2709 Beavil, y col. 2007. "Activated Ezrin Promotes Cell Migration through Recruitment of the GEF Dbl to Lipid  
2710 Rafts and Preferential Downstream Activation of Cdc42." *Molecular Biology of the Cell* 18 (8). American  
2711 Society for Cell Biology: 2935–48. doi:[10.1091/mbc.E06-11-1031](https://doi.org/10.1091/mbc.E06-11-1031).
- 2712 282. Qualmann, Britta, and Harry Mellor. 2003. *Regulation of Endocytic Traffic by Rho GTPases. The Biochemical*  
2713 *Journal*. Vol. 371. doi:[10.1042/BJ20030139](https://doi.org/10.1042/BJ20030139).
- 2714 283. Ribet, David, and Pascale Cossart. 2015. "How Bacterial Pathogens Colonize Their Hosts and Invade Deeper  
2715 Tissues." *Microbes and Infection* 17 (3). Elsevier Masson: 173–83. doi:[10.1016/j.micinf.2015.01.004](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.01.004).
- 2716 284. Robert, Amélie, Caroline Hookway, and Vladimir I Gelfand. 2016. "Intermediate Filament Dynamics: What  
2717 We Can See Now and Why It Matters." *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and*  
2718 *Developmental Biology* 38 (3): 232–43. doi:[10.1002/bies.201500142](https://doi.org/10.1002/bies.201500142).
- 2719 285. Rolli-Derkinderen, Malvyne, Vincent Sauzeau, Laurent Boyer, Emmanuel Lemichez, Celine Baron, Daniel  
2720 Henrion, Gervaise Loirand, and Pierre Pacaud. 2005. "Phosphorylation of Serine 188 Protects RhoA from  
2721 Ubiquitin/proteasome-Mediated Degradation in Vascular Smooth Muscle Cells." *Circulation Research* 96  
2722 (11). United States: 1152–60. doi:[10.1161/01.RES.0000170084.88780.ea](https://doi.org/10.1161/01.RES.0000170084.88780.ea).
- 2723 286. Romano, Patricia S., Maximiliano G. Gutierrez, Walter Berón, Michel Rabinovitch, and María I. Colombo.  
2724 2007. "The Autophagic Pathway Is Actively Modulated by Phase II *Coxiella Burnetii* to Efficiently Replicate  
2725 in the Host Cell." *Cellular Microbiology* 9 (4): 891–909. doi:[10.1111/j.1462-5822.2006.00838.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00838.x).
- 2726 287. Rosales, Eliana M, Milton O Aguilera, Romina P Salinas, Sergio A Carminati, María I Colombo, Narcisa  
2727 Martinez-Quiles, and Walter Berón. 2012. "Cortactin Is Involved in the Entry of *Coxiella Burnetii* into Non-  
2728 Phagocytic Cells." Edited by Dario S. Zamboni. *PLoS ONE* 7 (6). Public Library of Science: e39348.  
2729 doi:[10.1371/journal.pone.0039348](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039348).



- 2730 288. Rouiller, Isabelle, Xiao-Ping Xu, Kurt J Amann, Coumaran Egile, Stephan Nickell, Daniela Nicastro, Rong Li,  
2731 Thomas D Pollard, Niels Volkman, and Dorit Hanein. 2008. "The Structural Basis of Actin Filament  
2732 Branching by the Arp2/3 Complex." *The Journal of Cell Biology* 180 (5). United States: 887–95.  
2733 doi:10.1083/jcb.200709092.
- 2734 289. Rouven Brückner, Bastian, Anna Pietuch, Stefan Nehls, Jan Rother, and Andreas Janshoff. 2015. "Ezrin Is a  
2735 Major Regulator of Membrane Tension in Epithelial Cells." *Scientific Repor.* 5. Nature Publishing Group:  
2736 14700. doi:10.1038/srep14700.
- 2737 290. Roy, Christian, Marianne Martin, and Paul Mangeat. 1997. "A Dual Involvement of the Amino-Terminal  
2738 Domain of Ezrin in F- and G-Actin Binding." *Journal of Biological Chemistry* 272 (32). American Society for  
2739 Biochemistry and Molecular Biology: 20088–95. doi:10.1074/jbc.272.32.20088.
- 2740 291. Roy, Craig R., and Jonathan C. Kagan. 2013. "Evasion of Phagosome Lysosome Fusion and Establishment of  
2741 a Replicative Organelle by the Intracellular Pathogen Legionella Pneumophila." *Landes Bioscience*.
- 2742 292. Saffarian, Saveez, Emanuele Cocucci, and Tomas Kirchhausen. 2009. "Distinct Dynamics of Endocytic  
2743 Clathrin-Coated Pits and Coated Plaques." Edited by Fred Hughson. *PLoS Biology* 7 (9): e1000191.  
2744 doi:10.1371/journal.pbio.1000191.
- 2745 293. Salinas, Romina P., Rodolfo M. Ortiz Flores, Jesús S. Distel, Milton O. Aguilera, María I. Colombo, and  
2746 Walter Berón. 2015. "Coxiella Burnetii Phagocytosis Is Regulated by GTPases of the Rho Family and the  
2747 RhoA Effectors mDia1 and ROCK." Edited by Daniel E. Voth. *PLOS ONE* 10 (12): e0145211.  
2748 doi:10.1371/journal.pone.0145211.
- 2749 294. Sandquist, Joshua C, and Anthony R Means. 2008. "The C-Terminal Tail Region of Nonmuscle Myosin II  
2750 Directs Isoform-Specific Distribution in Migrating Cells." *Molecular Biology of the Cell* 19 (12). United States:  
2751 5156–67. doi:10.1091/mbc.E08-05-0533.
- 2752 295. Sandvig, K, S Olsnes, J E Brown, O W Petersen, and B van Deurs. 1989. "Endocytosis from Coated Pits of  
2753 Shiga Toxin: A Glycolipid-Binding Protein from Shigella Dysenteriae 1." *The Journal of Cell Biology* 108 (4):  
2754 1331–43.
- 2755 296. Schmidt, Oliver, and David Teis. 2012. "The ESCRT Machinery." *Current Biology* 22 (4). Elsevier: R116–20.  
2756 doi:10.1016/j.cub.2012.01.028.
- 2757 297. Schulze-Luehrmann, Jan, Rita A. Eckart, Martha Ölke, Paul Saftig, Elisabeth Liebler-Tenorio, and Anja  
2758 Lührmann. 2016. "LAMP Proteins Account for the Maturation Delay during the Establishment of the  
2759 Coxiella Burnetii-Containing Vacuole." *Cellular Microbiology* 18 (2): 181–94. doi:10.1111/cmi.12494.
- 2760 298. Scott, Cameron C., Fabrizio Vacca, and Jean Gruenberg. 2014. "Endosome Maturation, Transport and  
2761 Functions." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 31 (July): 2–10. doi:10.1016/j.semcdb.2014.03.034.
- 2762 299. Sept, D, and J A McCammon. 2001. "Thermodynamics and Kinetics of Actin Filament Nucleation."  
2763 *Biophysical Journal* 81 (2). The Biophysical Society: 667–74. doi:10.1016/S0006-3495(01)75731-1.
- 2764 300. Serino, Laura, Barbara Nesta, Rosanna Leuzzi, Maria Rita Fontana, Elisabetta Monaci, Brian T Mocca, Elena  
2765 Cartocci, y col. 2007. "Identification of a New OmpA-like Protein in Neisseria Gonorrhoeae Involved in the  
2766 Binding to Human Epithelial Cells and in Vivo Colonization." *Molecular Microbiology* 64 (5). England:  
2767 1391–1403. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05745.x.
- 2768 301. Seshadri, Rekha, Ian T Paulsen, Jonathan A Eisen, Timothy D Read, K. E. Nelson, William C Nelson, Naomi  
2769 L Ward, y col. 2003. "Complete Genome Sequence of the Q-Fever Pathogen Coxiella Burnetii." *Proceedings*

2770 of the National Academy of Sciences 100 (9). National Academy of Sciences: 5455–60.  
 2771 doi:10.1073/pnas.0931379100.

2772 302. Shannon, Jeffrey G, and Robert A Heinzen. 2008. "Infection of Human Monocyte-Derived Macrophages  
 2773 with Coxiella Burnetii." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 431. United States: 189–200.

2774 303. Shen, Keng. 2013. "Identification of a Cancer Stem Cell-like Side Population in the HeLa Human Cervical  
 2775 Carcinoma Cell Line." *Oncology Letters* 6 (6). D.A. Spandidos: 1673–80. doi:10.3892/ol.2013.1607.

2776 304. Shen, Yang, Monica Naujokas, Morag Park, and Keith Ireton. 2000. "InIB-Dependent Internalization of  
 2777 Listeria Is Mediated by the Met Receptor Tyrosine Kinase." *Cell* 103 (3): 501–10.

2778 305. Sigismund, Sara, Elisabetta Argenzio, Daniela Tosoni, Elena Cavallaro, Simona Polo, Pier Paolo Di Fiore, D.J.  
 2779 Montell, y col. 2008. "Clathrin-Mediated Internalization Is Essential for Sustained EGFR Signaling but  
 2780 Dispensable for Degradation." *Developmental Cell* 15 (2). Elsevier: 209–19. doi:10.1016/j.devcel.2008.06.012.

2781 306. Silvius, John R. 2003. "Role of Cholesterol in Lipid Raft Formation: Lessons from Lipid Model Systems."  
 2782 *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1610 (2): 174–83. doi:https://doi.org/10.1016/S0005-  
 2783 2736(03)00016-6.

2784 307. Simonsen, Anne, Roger Lippe, Savvas Christoforidis, Jean-Michel Gaullier, Andreas Brech, Judy Callaghan,  
 2785 Ban-Hock Toh, Carol Murphy, Marino Zerial, and Harald Stenmark. 1998. "EEA1 Links PI(3)K Function to  
 2786 Rab5 Regulation of Endosome Fusion." *Nature* 394 (July). Macmillan Magazines Ltd.: 494.

2787 308. Skoudy, Anouchka, Joelle Mounier, Alejandro Aruffo, Hélène Ohayon, Pierre Gounon, Philippe Sansonetti,  
 2788 and Guy Tran Van Nhieu. 2000. "CD44 Binds to the Shigella IpaB Protein and Participates in Bacterial  
 2789 Invasion of Epithelial Cells." *Cellular Microbiology* 2 (1): 19–33. doi:10.1046/j.1462-5822.2000.00028.x.

2790 309. Skoudy, Anouchka, Guy Tran Van Nhieu, Nicholas Mantis, Monique Arpin, Joëlle Mounier, Pierre Gounon,  
 2791 Philippe Sansonetti, Unité De Pathogénie, Microbienne Moléculaire, and U Inserm. 1999. "A Functional  
 2792 Role for Ezrin during Shigella Flexneri Entry into Epithelial Cells." *Journal of Cell Science* 112 ( Pt 1 (July):  
 2793 2059–68.

2794 310. Smith, G A, H Marquis, S Jones, N C Johnston, D A Portnoy, and H Goldfine. 1995. "The Two Distinct  
 2795 Phospholipases C of Listeria Monocytogenes Have Overlapping Roles in Escape from a Vacuole and Cell-to-  
 2796 Cell Spread." *Infection and Immunity* 63 (11). American Society for Microbiology (ASM): 4231–37.

2797 311. Sobotta, Katharina, Katharina Bonkowski, Elisabeth Liebler-Tenorio, Pierre Germon, Pascal Rainard, Nina  
 2798 Hambruch, Christiane Pfarrer, Ilse D. Jacobsen, and Christian Menge. 2017. "Permissiveness of Bovine  
 2799 Epithelial Cells from Lung, Intestine, Placenta and Udder for Infection with Coxiella Burnetii." *Veterinary*  
 2800 *Research* 48 (1). BioMed Central: 1–15. doi:10.1186/s13567-017-0430-9.

2801 312. Sobotta, Katharina, Kirstin Hillarius, Marvin Mager, Katharina Kerner, Carsten Heydel, and Christian  
 2802 Menge. 2016. "Coxiella Burnetii Infects Primary Bovine Macrophages and Limits Their Host Cell Response."  
 2803 *Infection and Immunity* 84 (6): 1722–34. doi:10.1128/IAI.01208-15.

2804 313. Steele-Mortimer, Olivia. 2008. "The Salmonella-Containing Vacuole: Moving with the Times." *Current*  
 2805 *Opinion in Microbiology* 11 (1). NIH Public Access: 38–45. doi:10.1016/j.mib.2008.01.002.

2806 314. Steele, Shaun, Jason Brunton, and Thomas Kawula. 2015. "The Role of Autophagy in Intracellular Pathogen  
 2807 Nutrient Acquisition." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 5. Frontiers Media SA: 51.  
 2808 doi:10.3389/fcimb.2015.00051.

- 2809 315. Stein, A, N A Saunders, A G Taylor, and D Raoult. 1993. "Phylogenic Homogeneity of Coxiella Burnetii  
2810 Strains as Determined by 16S Ribosomal RNA Sequencing." *FEMS Microbiology Letters* 113 (3): 339–44.
- 2811 316. Stevenson, Richard P, Douwe Veltman, and Laura M Machesky. 2012. "Actin-Bundling Proteins in Cancer  
2812 Progression at a Glance." *Journal of Cell Science* 125 (5): 1073 LP-1079.
- 2813 317. Suetsugu, Shiro. 2013. "Activation of Nucleation Promoting Factors for Directional Actin Filament  
2814 Elongation: Allosteric Regulation and Multimerization on the Membrane." *Seminars in Cell and  
2815 Developmental Biology* 24 (4). Elsevier Ltd: 267–71. doi:10.1016/j.semcdb.2013.01.006.
- 2816 318. Sumi, T, K Matsumoto, A Shibuya, and T Nakamura. 2001. "Activation of LIM Kinases by Myotonic  
2817 Dystrophy Kinase-Related Cdc42-Binding Kinase Alpha." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (25).  
2818 United States: 23092–96. doi:10.1074/jbc.C100196200.
- 2819 319. Sumi, Tomoyuki, Kunio Matsumoto, and Toshikazu Nakamura. 2001. "Specific Activation of LIM Kinase 2  
2820 via Phosphorylation of Threonine 505 by ROCK, a Rho-Dependent Protein Kinase." *The Journal of Biological  
2821 Chemistry* 276 (1). United States: 670–76. doi:10.1074/jbc.M007074200.
- 2822 320. Sumi, Tomoyuki, Kunio Matsumoto, Yoshimi Takai, and Toshikazu Nakamura. 1999. "Cofilin  
2823 Phosphorylation and Actin Cytoskeletal Dynamics Regulated by Rho- and Cdc42-Activated LIM-Kinase 2."  
2824 *The Journal of Cell Biology* 147 (7): 1519–32. doi:10.1083/jcb.147.7.1519.
- 2825 321. Sun-Wada, G.-H., H. Tabata, N. Kawamura, M. Aoyama, and Y. Wada. 2009. "Direct Recruitment of H+-  
2826 ATPase from Lysosomes for Phagosomal Acidification." *Journal of Cell Science* 122 (14): 2504–13.  
2827 doi:10.1242/jcs.050443.
- 2828 322. Swanson, Kena A, Deborah D Crane, and Harlan D Caldwell. 2007. "Chlamydia Trachomatis Species-  
2829 Specific Induction of Ezrin Tyrosine Phosphorylation Functions in Pathogen Entry." *Infection and Immunity*  
2830 75 (12). American Society for Microbiology: 5669–77. doi:10.1128/IAI.01096-07.
- 2831 323. Takahashi, Kazuo, Takuya Sasaki, Akiko Mammoto, Kenji Takaishi, Takaaki Kameyama, Shoichiro Sachiko  
2832 Tsukita, Yoshimi Takai, Yoshimi Takai, Shoichiro Sachiko Tsukita, and Yoshimi Takai. 1997. "Direct  
2833 Interaction of the Rho GDP Dissociation Inhibitor with Ezrin/radixin/moesin Initiates the Activation of the  
2834 Rho Small G Protein." *Journal of Biological Chemistry* 272 (37). American Society for Biochemistry and  
2835 Molecular Biology: 23371–75. doi:10.1074/jbc.272.37.23371.
- 2836 324. Takemoto, Kenji, Seiichiro Ishihara, Takeomi Mizutani, Kazushige Kawabata, and Hisashi Haga. 2015.  
2837 "Compressive Stress Induces Dephosphorylation of the Myosin Regulatory Light Chain via RhoA  
2838 Phosphorylation by the Adenylyl Cyclase/protein Kinase A Signaling Pathway." *PloS One* 10 (3). United  
2839 States: e0117937. doi:10.1371/journal.pone.0117937.
- 2840 325. Thankamony, Sai P., and Warren Knudson. 2006. "Acylation of CD44 and Its Association with Lipid Rafts  
2841 Are Required for Receptor and Hyaluronan Endocytosis." *Journal of Biological Chemistry* 281 (45): 34601–9.  
2842 doi:10.1074/jbc.M601530200.
- 2843 326. Thorne, Rick F., James W Legg, Clare M Isacke, R Hyman, and I S Trowbridge. 2003. "The Role of the CD44  
2844 Transmembrane and Cytoplasmic Domains in Co-Ordinating Adhesive and Signalling Events." *Journal of  
2845 Cell Science* 117 (3). The Company of Biologists Ltd: 373–80. doi:10.1242/jcs.00954.
- 2846 327. Tissot-Dupont, Hervé, Marie-Antoinette Amadei, Meyer Nezri, and Didier Raoult. 2004. "Wind in  
2847 November, Q Fever in December." *Emerging Infectious Diseases* 10 (7). Centers for Disease Control and  
2848 Prevention: 1264–69. doi:10.3201/eid1007.030724.

- 2849 328. Tkachenko, Eugene, Mohsen Sabouri-Ghomi, Olivier Pertz, Chungho Kim, Edgar Gutierrez, Matthias  
2850 Machacek, Alex Groisman, Gaudenz Danuser, and Mark H Ginsberg. 2011. "Protein Kinase A Governs a  
2851 RhoA-RhoGDI Protrusion-Retraction Pacemaker in Migrating Cells." *Nature Cell Biology* 13 (6). England:  
2852 660–67. doi:10.1038/ncb2231.
- 2853 329. Tomoyuki, Sumi, Matsumoto Kunio, Takai Yoshimi, and Nakamura Toshikazu. 1999. "Cofilin  
2854 Phosphorylation and Actin Cytoskeletal Dynamics Regulated by Rho- and Cdc42-Activated LIM-Kinase 2."  
2855 *The Journal of Cell Biology* 147 (7): 1519–32.
- 2856 330. Tran Van Nhieu, G, R Bourdet-Sicard, G Duménil, A Blocker, and P J Sansonetti. 2000. "Bacterial Signals  
2857 and Cell Responses during Shigella Entry into Epithelial Cells." *Cellular Microbiology* 2 (3): 187–93.
- 2858 331. Tsukita, S, Y Hieda, and S Tsukita. 1989. "A New 82-kD Barbed End-Capping Protein (Radixin) Localized in  
2859 the Cell-to-Cell Adherens Junction: Purification and Characterization." *The Journal of Cell Biology* 108 (6).  
2860 United States: 2369–82.
- 2861 332. Ueyama, Takehiko, Jeonghyun Son, Takeshi Kobayashi, Takeshi Hamada, Takashi Nakamura, Hirofumi  
2862 Sakaguchi, Toshihiko Shirafuji, and Naoaki Saito. 2013. "Negative Charges in the Flexible N-Terminal  
2863 Domain of Rho GDP-Dissociation Inhibitors (RhoGDIs) Regulate the Targeting of the RhoGDI-Rac1  
2864 Complex to Membranes." *The Journal of Immunology* 191 (5): 2560–69. doi:10.4049/jimmunol.1300209.
- 2865 333. Urso, Katia, Julia F. Charles, Gary E. Shull, Antonios O. Aliprantis, and Barbara Balestrieri. 2016. "Anion  
2866 Exchanger 2 Regulates Dectin-1-Dependent Phagocytosis and Killing of Candida Albicans." Edited by  
2867 Rebecca A Hall. *PLOS ONE* 11 (7): e0158893. doi:10.1371/journal.pone.0158893.
- 2868 334. Vachon, Eric, Raiza Martin, Vivian Kwok, Vera Cherepanov, C.-W. Chung-wai Chow, Claire M Doerschuk,  
2869 Jonathan Plumb, Sergio Grinstein, and Gregory P Downey. 2007. "CD44-Mediated Phagocytosis Induces  
2870 inside-out Activation of Complement Receptor-3 in Murine Macrophages." *Blood* 110 (13). American  
2871 Society of Hematology: 4492–4502. doi:10.1182/blood-2007-02-076539.
- 2872 335. Vachon, Eric, Raiza Martin, Jonathan Plumb, Vivian Kwok, R William Vandivier, Michael Glogauer, Andras  
2873 Kapus, y col. 2006. "CD44 Is a Phagocytic Receptor." *Blood* 107 (10). American Society of Hematology:  
2874 4149–59. doi:10.1182/blood-2005-09-3808.
- 2875 336. Vale, Ronald D. 1987. "Intracellular Transport Using Microtubule-Based Motors." *Annual Review of Cell*  
2876 *Biology* 3 (1). Annual Reviews: 347–78. doi:10.1146/annurev.cb.03.110187.002023.
- 2877 337. Valiron, O, N Caudron, and D Job. 2001. "Microtubule Dynamics." *Cellular and Molecular Life Sciences :*  
2878 *CMLS* 58 (14). Switzerland: 2069–84. doi:10.1007/PL00000837.
- 2879 338. van Schaik, Erin J., Chen Chen, Katja Mertens, Mary M. Weber, and James E. Samuel. 2013. "Molecular  
2880 Pathogenesis of the Obligate Intracellular Bacterium Coxiella Burnetii." *Nature Reviews Microbiology* 11 (8).  
2881 Nature Research: 561–73. doi:10.1038/nrmicro3049.
- 2882 339. Vandekerckhove, Joel, and Klaus Weber. 1978. "At Least Six Different Actins Are Expressed in a Higher  
2883 Mammal: An Analysis Based on the Amino Acid Sequence of the Amino-Terminal Tryptic Peptide." *Journal*  
2884 *of Molecular Biology* 126 (4): 783–802. doi:10.1016/0022-2836(78)90020-7.
- 2885 340. Velge, P, A Wiedemann, M Rosselin, N Abed, Z Boumart, A M Chaussé, O Grépinet, y col. 2012.  
2886 "Multiplicity of Salmonella Entry Mechanisms, a New Paradigm for Salmonella Pathogenesis."  
2887 *MicrobiologyOpen* 1 (3). Wiley-Blackwell: 243–58. doi:10.1002/mbo3.28.

- 2888 341. Vergne, Isabelle, Jennifer Chua, Hwang-Ho Lee, Megan Lucas, John Belisle, and Vojo Deretic. 2005.  
2889 "Mechanism of Phagolysosome Biogenesis Block by Viable Mycobacterium Tuberculosis." *Proceedings of the*  
2890 *National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (11). National Academy of Sciences: 4033–  
2891 38. doi:10.1073/pnas.0409716102.
- 2892 342. Vicente-Manzanares, Miguel, Xuefei Ma, Robert S. Adelstein, and Alan Rick Horwitz. 2009. "Non-Muscle  
2893 Myosin II Takes Centre Stage in Cell Adhesion and Migration." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10  
2894 (11): 778–90. doi:10.1038/nrm2786.
- 2895 343. Vieira, Otilia V., Cecilia Bucci, Rene E. Harrison, William S. Trimble, Letizia Lanzetti, Jean Gruenberg, Alan  
2896 D. Schreiber, Philip D. Stahl, and Sergio Grinstein. 2003. "Modulation of Rab5 and Rab7 Recruitment to  
2897 Phagosomes by Phosphatidylinositol 3-Kinase." *Molecular and Cellular Biology* 23 (7). American Society for  
2898 Microbiology (ASM): 2501–14. doi:10.1128/MCB.23.7.2501-2514.2003.
- 2899 344. Visvikis, Orane, Madhavi P Maddugoda, and Emmanuel Lemichez. 2010. "Direct Modifications of Rho  
2900 Proteins: Deconstructing GTPase Regulation." *Biology of the Cell* 102 (7): 377–89. doi:10.1042/BC20090151.
- 2901 345. Walker, R A, E T O'Brien, N K Pryer, M F Soboeiro, W A Voter, H P Erickson, and E D Salmon. 1988.  
2902 "Dynamic Instability of Individual Microtubules Analyzed by Video Light Microscopy: Rate Constants and  
2903 Transition Frequencies." *The Journal of Cell Biology* 107 (4). United States: 1437–48.
- 2904 346. Wang, Ying, Tadayuki Yago, Nan Zhang, Salim Abdisalaam, George Alexrakis, William Rodgers, Rodger P.  
2905 McEver, George Alexandrakis, William Rodgers, and Rodger P. McEver. 2014. "Cytoskeletal Regulation of  
2906 CD44 Membrane Organization and Interactions with E-Selectin." *Journal of Biological Chemistry* 289 (51):  
2907 35159–71. doi:10.1074/jbc.M114.600767.
- 2908 347. Wasylnka, Julie A, Malina A Bakowski, Jason Szeto, Maikke B Ohlson, William S Trimble, Samuel I Miller,  
2909 and John H Brumell. 2008. "Role for Myosin II in Regulating Positioning of Salmonella-Containing Vacuoles  
2910 and Intracellular Replication." *Infection and Immunity* 76 (6). United States: 2722–35.  
2911 doi:10.1128/IAI.00152-08.
- 2912 348. Watanabe, Kenta, Masato Tachibana, Suk Kim, and Masahisa Watarai. 2009. "Participation of Ezrin in  
2913 Bacterial Uptake by Trophoblast Giant Cells." *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E* 7  
2914 (September). BioMed Central: 95. doi:10.1186/1477-7827-7-95.
- 2915 349. Wei, Jianxin, Rachel K Mialki, Su Dong, Andrew Khoo, Rama K Mallampalli, Yutong Zhao, and Jing Zhao.  
2916 2013. "A New Mechanism of RhoA Ubiquitination and Degradation: Roles of SCF(FBXL19) E3 Ligase and  
2917 Erk2." *Biochimica et Biophysica Acta* 1833 (12). Netherlands: 2757–64. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.07.005.
- 2918 350. Weisburg, W G, M E Dobson, J E Samuel, G A Dasch, L P Mallavia, O Baca, L Mandelco, J E Sechrest, E  
2919 Weiss, and C R Woese. 1989. "Phylogenetic Diversity of the Rickettsiae." *Journal of Bacteriology* 171 (8):  
2920 4202–6.
- 2921 351. Wen, Wenyu, Wei Liu, Jing Yan, and Mingjie Zhang. 2008. "Structure Basis and Unconventional Lipid  
2922 Membrane Binding Properties of the PH-C1 Tandem of Rho Kinases." *The Journal of Biological Chemistry*  
2923 283 (38). United States: 26263–73. doi:10.1074/jbc.M803417200.
- 2924 352. Wieczorek, Michal, Susanne Bechstedt, Sami Chaaban, and Gary J Brouhard. 2015. "Microtubule-Associated  
2925 Proteins Control the Kinetics of Microtubule Nucleation." *Nature Cell Biology* 17 (7). England: 907–16.  
2926 doi:10.1038/ncb3188.

- 2927 353. Winchell, Caylin G, Joseph G Graham, Richard C Kurten, and Daniel E Voth. 2014. "Coxiella Burnetii Type  
2928 IV Secretion-Dependent Recruitment of Macrophage Autophagosomes." *Infection and Immunity* 82 (6).  
2929 American Society for Microbiology (ASM): 2229–38. doi:10.1128/IAI.01236-13.
- 2930 354. Wu, Yimin, Konstadinos Moissoglou, Hong Wang, Xuejiao Wang, Henry F Frierson, Martin A Schwartz, and  
2931 Dan Theodorescu. 2009. "Src Phosphorylation of RhoGDI2 Regulates Its Metastasis Suppressor Function."  
2932 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (14). National Academy  
2933 of Sciences: 5807–12. doi:10.1073/pnas.0810094106.
- 2934 355. Yam, Patricia T, and Julie A Theriot. 2004. "Repeated Cycles of Rapid Actin Assembly and Disassembly on  
2935 Epithelial Cell Phagosomes." *Molecular Biology of the Cell* 15 (12): 5647–58. doi:10.1091/mbc.E04-06-0509.
- 2936 356. Yoneda, Atsuko, Hinke A B Multhaupt, and John R Couchman. 2005. "The Rho Kinases I and II Regulate  
2937 Different Aspects of Myosin II Activity." *The Journal of Cell Biology* 170 (3): 443 LP-453.
- 2938 357. Yonemura, S, M Hirao, Y Doi, N Takahashi, T Kondo, S Tsukita, and S Tsukita. 1998. "Ezrin/radixin/moesin  
2939 (ERM) Proteins Bind to a Positively Charged Amino Acid Cluster in the Juxta-Membrane Cytoplasmic  
2940 Domain of CD44, CD43, and ICAM-2." *The Journal of Cell Biology* 140 (4): 885–95.
- 2941 358. Yonemura, Shigenobu, Takeshi Matsui, Shoichiro Tsukita, and Sachiko Tsukita. 2002. "Rho-Dependent and  
2942 -Independent Activation Mechanisms of Ezrin/radixin/moesin Proteins: An Essential Role for  
2943 Polyphosphoinositides in Vivo." *Journal of Cell Science* 115 (Pt 12). England: 2569–80.
- 2944 359. Zamboni, Dario S., Marco A. Campos, Ana C. T. Torrecilhas, Kati Kiss, James E. Samuel, Douglas T.  
2945 Golenbock, Fanny N. Lauw, Craig R. Roy, Igor C. Almeida, and Ricardo T. Gazzinelli. 2004. "Stimulation of  
2946 Toll-like Receptor 2 by Coxiella Burnetii Is Required for Macrophage Production of pro-Inflammatory  
2947 Cytokines and Resistance to Infection." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (52): 54405–15.  
2948 doi:10.1074/jbc.M410340200.
- 2949 360. Zamboni, Dario S, Susan McGrath, Michel Rabinovitch, and Craig R Roy. 2003. "Coxiella Burnetii Express  
2950 Type IV Secretion System Proteins That Function Similarly to Components of the Legionella Pneumophila  
2951 Dot/Icm System." *Molecular Microbiology* 49 (4): 965–76.
- 2952 361. Zamudio-Meza, Horacio, Aida Castillo-Alvarez, Cesar Gonzalez-Bonilla, and Isaura Meza. 2009. "Cross-Talk  
2953 between Rac1 and Cdc42 GTPases Regulates Formation of Filopodia Required for Dengue Virus Type-2  
2954 Entry into HMEC-1 Cells." *The Journal of General Virology* 90 (Pt 12). England: 2902–11.  
2955 doi:10.1099/vir.0.014159-0.
- 2956 362. Zhang, Fangliang, Frederick S Southwick, and Daniel L Purich. 2002. "Actin-Based Phagosome Motility."  
2957 *Cell Motility and the Cytoskeleton* 53 (2). United States: 81–88. doi:10.1002/cm.10058.
- 2958 363. Zhang, Min, and P. Vasantha Rao. 2005. "Blebbistatin, a Novel Inhibitor of Myosin II ATPase Activity,  
2959 Increases Aqueous Humor Outflow Facility in Perfused Enucleated Porcine Eyes." *Investigative  
2960 Ophthalmology & Visual Science* 46 (11): 4130–38. doi:10.1167/iovs.05-0164.
- 2961 364. Zhu, Lixin, Rihong Zhou, Shelley Mettler, Tim Wu, Aennes Abbas, Joseph Delaney, and John G Forte. 2007.  
2962 "High Turnover of Ezrin T567 Phosphorylation: Conformation, Activity, and Cellular Function." *AJP: Cell  
2963 Physiology* 293 (3): C874–84. doi:10.1152/ajpcell.00111.2007.
- 2964